

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der
Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Einfluß einer Virusdosisescalation beim adenoviralen LDL-
Rezeptorgentransfer im Kaninchenmodell**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nicole Grewe

aus Braunschweig

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H. Schmidt

2. Prof. Dr. med. S. Wagner

3. Prof. Dr. med. W. Burchert

Datum der Promotion: 09.02.2005

Abstract

Die autosomal-dominant vererbte Familiäre Hypercholesterinämie ist durch eine exzessive Erhöhung der LDL-Serumcholesterinspiegel gekennzeichnet und bedingt aufgrund einer prämaternen Atherosklerose den frühzeitigen Tod der Patienten. Da ursächlich ein defekter LDL-Rezeptor (LDL-R) zugrundeliegt, der durch Mutationen im Bereich des LDL-R-Gens hervorgerufen wird, kommt der Gentherapie als potentieller Behandlungsmöglichkeit ein besonderer Stellenwert zu. Diese Arbeit untersuchte den Einfluß einer Virusdosis-escalation auf Cholesterinsenkung und Langzeitexpression im adenoviral vermittelten LDL-R-Gentransferversuch im Kaninchenmodell. Hierfür wurden 7 Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen, welche an einer vergleichbaren kongenitalen Hypercholesterinämie durch einen LDL-R-Defekt leiden, mit unterschiedlichen Dosierungen eines Adenovirus des Serotyps 5 therapiert, der die Gensequenz für den humanen LDL-R enthielt. Vor und nach Therapie wurden Bestimmungen der Serumcholesterinkonzentrationen und LDL-Stoffwechselkinetiken mit ^{125}I -LDL sowie semiquantitative szintigraphische Auswertungen durch ^{111}In -LDL-Scans durchgeführt. Hierbei mußte festgestellt werden, dass die adenoviral vermittelte transgene Expression des LDL-R durch die Bestimmung des Serumcholesterins nicht korrekt wiedergegeben wird. Denn zum einen konnte bei der Bestimmung des Serumcholesterins ein dosisabhängiger Effekt beobachtet werden, dieser zeigte sich bei den Stoffwechselkinetiken mit ^{125}I -LDL und bei den Scanuntersuchungen mit ^{111}In -LDL jedoch nicht. Zum anderen kam es innerhalb von 12-18 Tagen nach Gentransfer zu einem Wiedererreichen der Serumcholesterinausgangswerte, wohingegen die in vivo-Stoffwechselkinetiken eine erhöhte Abbaurate radiomarkierter LDL und die Szintigraphie eine LDL-R-Expression über die gesamte Dauer des Experimentes von 120 Tagen belegten.

Schlagwörter

Familiäre Hypercholesterinämie, LDL-R-Gentransfer, Adenovirus, WHHL-Kaninchen

Abstract

Familial hypercholesterolemia is an autosomal dominantly inherited disease characterized by an excessive elevation of serum LDL cholesterol which leads to premature atherosclerosis and an early death of the patients. As the reason is a defective LDL receptor (LDLR) caused by mutations in the gene encoding LDLR, gene therapy plays an increasingly important role as a treatment possibility. This paper examined the influence of an escalation of the virus dose on the cholesterol reduction and long-term expression in the adenovirally mediated LDLR gene therapy experiment using a rabbit animal model. To facilitate this 7 Watanabe Heritable Hyperlipidemic rabbits, suffering from an equivalent congenital hypercholesterolemia due to a LDLR defect, were treated with different doses of a serotype 5 adenovirus which contained the gene sequence of the human LDLR. Pre and post gene therapy measurements of the serum cholesterol levels and kinetics of LDL metabolism with ^{125}I -LDL were performed, as well as semiquantitative scintigraphic analysis of ^{111}In -LDL scans. The finding was that the adenovirally mediated transgene expression of the LDLR was not correctly reflected by the measurement of the serum cholesterol levels. This was because of a dose dependant effect concerning the measurements of the serum LDL cholesterol levels, which did not appear regarding the kinetics of LDL metabolism with ^{125}I -LDL and the scans with ^{111}In -LDL. Moreover, the serum cholesterol levels reached their initial value within 12-18 days post gene transfer whilst the in vivo-kinetics of LDL metabolism showed an increased catabolic rate of radiolabeled LDL and the scintigraphy indicated a LDLR expression for the whole period of the experiment lasting 120 days.

Keywords

familial hypercholesterolemia, LDLR gene therapy, adenovirus, WHHL rabbit

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Gentherapie	1
1.2	Lipidstoffwechsel	10
1.2.1	Lipide	10
1.2.2	Lipoproteine	12
1.2.3	Apolipoproteine.....	14
1.2.4	Stoffwechsel der Lipoproteine	15
1.2.5	Stoffwechsel der Low Density Lipoproteine	18
1.2.6	Low Density Lipoprotein-Rezeptor und LDL-Rezeptorzyklus	19
1.3	Familiäre Hypercholesterinämie	22
1.3.1	Geno- und phänotypische Charakteristika der Familiären Hypercholesterinämie	22
1.3.2	Konventionelle Therapie der Familiären Hypercholesterinämie	26
1.3.3	Gentherapeutische Ansätze der FH im Tiermodell	27
2.	AUFGABENSTELLUNG.....	29
3.	MATERIAL UND METHODEN	30
3.1	Gentherapeutische Methoden	30
3.1.1	Vektor.....	30
3.1.2	Präparation des Virus	30
3.1.3	Gentherapie und Scantechnik.....	31
3.2	Lipoproteingewinnung und -aufbereitung.....	32
3.2.1	Isolation humaner Lipoproteine aus Serum	32
3.2.2	Radiomarkierung von LDL	34
3.2.2.1	Iod-Monochlorid-Methode.....	34

3.2.2.2	Radiomarkierung mit $^{111}\text{InCl}_3$	35
3.3	Stoffwechselkinetische Untersuchungen.....	36
3.3.1	Kaninchen.....	36
3.3.2	Kaninchenhaltung.....	36
3.3.3	Kinetik.....	36
3.3.4	Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC)-Analyse	37
3.4	Quantitative Methoden.....	37
3.4.1	Proteinbestimmung nach Lowry	37
3.4.2	Proteinbestimmung nach Bradford.....	38
3.4.3	Quantitative Triglyzeridbestimmung	40
3.4.4	Quantitative Cholesterinbestimmung.....	41
3.4.5	Qualitative und quantitative Plasmalipoproteinbestimmung mit der Lipidelektrophorese.....	42
4.	ERGEBNISSE	44
4.1	Selektion eines geeigneten Tiermodells.....	44
4.2	Gentransfer	46
4.3	Cholesterinverläufe nach Gentransfer mit Ad-CMV-hLDL-R	46
4.4	Selektion eines geeigneten Tracers zur LDL-Radiomarkierung.....	47
4.5	Stoffwechselkinetische Untersuchungen.....	48
4.5.1	Radioiodmarkierung.....	49
4.5.2	Stoffwechselkinetik vor Gentransfer.....	49
4.5.3	FPLC-Analyse der Lipoproteinverteilung im Kaninchenserum vor Gentransfer	50
4.5.4	Stoffwechselkinetik nach Gentransfer mit Ad-CMV-hLDL-R.....	51
4.5.5	FPLC-Analyse der Lipoproteinverteilung im Kaninchenserum nach Gentransfer mit Ad-CMV-hLDL-R	53

4.6	Scanuntersuchungen.....	54
4.6.1	LDL-Radiomarkierungen mit ¹¹¹ Indium	54
4.6.2	Scanuntersuchung vor Gentransfer	54
4.6.3	Scanuntersuchungen nach LDL-R-Gentransfer	55
4.6.4	Quantifizierung des Gentransfers.....	59
4.6.5	Bestimmung des günstigsten Untersuchungszeitpunktes.....	62
5.	DISKUSSION	63
6.	ZUSAMMENFASSUNG	74
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	76
8.	LITERATURVERZEICHNIS	79

1. EINLEITUNG

1.1 Gentherapie

Voraussetzung für die ersten gentherapeutischen Ansätze in den sechziger Jahren waren die großen molekularbiologischen Entdeckungen des vorangehenden Jahrzehnts, die entscheidende Aufschlüsse über die Struktur und Funktion von Genen brachten. So zeigten Avery, McLeod und McCarthy 1944 auf, dass die Nukleinsäuren die genetische Information tragen. 1953 präzisierten Watson und Crick diese Aussage im Rahmen ihres „Zentralen Dogmas der Molekularbiologie“, indem sie bewiesen, dass die genetische Information der DNA durch die Basensequenz codiert ist und die Informationsübertragung durch das Prinzip der Basenpaarung möglich ist [1]. Mit der Möglichkeit Gene zu isolieren und zu charakterisieren und den zunehmenden pathophysiologischen Erkenntnissen über viele Erkrankungen, wurde bald der Nachweis von Genmutationen erbracht, die zu bestimmten Krankheiten führen. Für diese bis dahin nur unzureichend oder gar nicht therapierbaren Erkrankungen ergaben sich somit neue therapeutische Perspektiven im Sinne einer kausalen Behandlung auf molekularer Ebene, der Gentherapie. Grundprinzip ist hierbei die Einbringung genetischen Materials in den erkrankten Organismus, das die entsprechende Störung beheben oder zumindest günstig beeinflussen soll [45, 46]. Prämisse für eine erfolgreiche Durchführung ist zunächst die Klärung pathophysiologischer Zusammenhänge einer Krankheit sowie die Aufdeckung des zugrundeliegenden molekularen Defekts. In diesem Kontext unterscheidet man monogenetische Erbkrankheiten, die auf dem Defekt eines einzelnen Gens beruhen (z.B. der defekte „cystic fibrosis transmembrane regulator“ bei der Mukoviszidose) von polygenetischen Erkrankungen (z.B. Krebs) sowie erworbenen genetischen Störungen (z.B. HIV) [5]. Tabelle 1 gibt hierbei einen Überblick über einige Erkrankungen sowie die ihnen zugrundeliegenden Gendefekte (soweit bekannt), welche Angriffspunkt heutiger gentherapeutischer Bemühungen sind.

Ist der molekularbiologische Aspekt einer Erkrankung identifiziert, gibt es verschiedene Möglichkeiten den Defekt auf zellulärer Ebene zu korrigieren. Ziel bei den monogenetischen Erkrankungen ist, durch das Einschleusen von Plasmid-DNA, RNA oder Oligonukleotiden in die Zielzelle das defekte Gen oder seine mRNA zu korrigieren bzw. ein intaktes Gen zusätzlich einzufügen. Die rekombinante mRNA produziert dann im Idealfall das therapeutisch wirkende Genprodukt, welches zelluläre Defekte in der Zielzelle korrigiert oder nach seiner Sekretion den

Zellmetabolismus an weiter entfernten Zielzellen beeinflusst. Hierdurch kommt es klinisch zur Ausbildung eines gesunden Phänotyps.

Monogenetische Erkrankungen		
Erkrankung	Gendefekt	Zielorgane/-gewebe
Adenosindesaminasemangel	Adenosindesaminase	Lymphatisches Gewebe
α 1-Antitrypsinmangel	α 1-Antitrypsin	Lunge, Leber
Zitrullinämie	Arginosuccinatsynthetase	
Zystische Fibrose	Cystic fibrosis transmembrane regulator	Lunge, Pankreas
Hämophilie A/B	Faktor VIII/ IX	Gerinnungsfaktoren
Fukosidose	α -L-Fukosidase	Lysosomen
Morbus Gaucher	Glukozerebrosidase	Makrophagen, Leber, Milz, Lunge
Mukopolysaccharidose Typ I/ VII	α -L-Iduronidase/ β -Glucuronidase	
Thalassämie	β -Globin	Erythrozyten
Sichelzellanämie	β -Globin	Erythrozyten
Familiäre Hypercholesterinämie	Low Density Lipoprotein-Rezeptor	Leber, Gefäßendothelien
Hyperammonämie	Ornithintranscarbamylase	
Morbus Niemann-Pick	Sphingomyelinase	Knochenmark, Leber, Milz, Lymphknoten
Phenylketonurie	Phenylalanin-Hydroxylase	
Polygenetische Erkrankungen		
Erkrankung	Gendefekt	Zielorgane
Krebs		Variabel
Kardiovaskuläre Erkrankungen		Gefäßendothel
Rheumatoide Arthritis		Gelenke
Erworbene genetische Erkrankungen		
Erkrankung	Gendefekt	Zielorgane
HIV-1		Immunsystem
Epstein-Barr		
Hepatitis		Leber

Tabelle 1: Genetische Erkrankungen als mögliche Gentherapieandidaten

Schwieriger gestaltet sich die Beeinflussung polygenetischer Erkrankungen, da hier immer noch viele pathophysiologische Mechanismen unbekannt und viele einzelne der Gendefekte nicht hinreichend bestimmt sind. Deshalb muß man sich hierbei oft darauf beschränken, ein therapeutisch wirkendes Protein in die Zelle einzubringen, welches die Symptomatik lindert. Dies geschieht durch das Ausstatten der Zielzelle mit einer neuen Funktion oder durch Verstärkung der positiven Einflüsse gesunder Gene (genetic augmentation), z.B. durch das Hervorrufen einer verstärkten Immunantwort auf Tumorzellen oder Induktion eines geplanten Zelltods von Tumorzellen im Rahmen der Krebstherapie [2, 3].

Prinzipiell muß anhand der Zielzellen eine Einteilung der Gentherapie in zwei Anwendungsgebiete vorgenommen werden. Man unterscheidet hierbei die somatische Gentherapie von der Keimbahntherapie. Erstere beruht auf dem Transfer von genetischem Material in somatische Zellen (Körperzellen), womit die Weitergabe an nachfolgende Generationen ausgeschlossen ist. Dies entspricht den Gesichtspunkten, unter denen momentan gentherapeutische Ansätze verfolgt werden. Die Keimbahntherapie hingegen beschreibt eine permanente Verankerung genetischer Informationen in embryonalen Zielzellen und somit eine Vererbbarkeit. Im Rahmen des Embryonenschutzgesetzes ist diese Form der Gentherapie in der Bundesrepublik Deutschland zum jetzigen Zeitpunkt allerdings nicht erlaubt [4, 32].

Um das therapeutisch wirkende genetische Material in die Zielzelle einzubringen, (Transfektion) sind unter strategischen Gesichtspunkten zwei Verfahren möglich [5, 32, 47, 103]. Das *ex vivo*-Verfahren beschreibt hierbei die Entnahme der Zielzellen aus dem Körper des Patienten (z.B. Hepatozyten), die nachfolgende Vermehrung in entsprechenden Medien und die Einbringung der DNA in die Zielzellen außerhalb des Körpers. Anschließend werden die behandelten Zellen in den Organismus reimplantiert. Beim *in vivo*-Gentransfer hingegen werden die rekombinanten Gene direkt oder mittels eines geeigneten Vektors in den Patientenkörper eingebracht. Die genetische Information gelangt also ohne Umwege in die Zielzellen, so dass die Transfektion im Körper stattfindet.

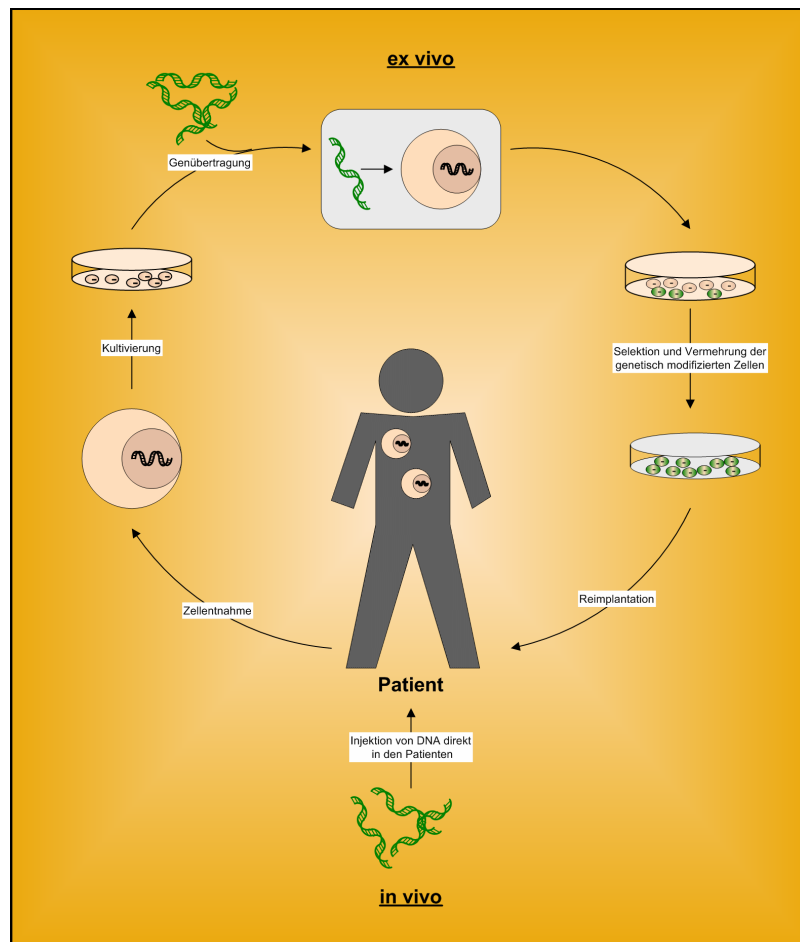


Abbildung 1: *In vivo*- und *ex vivo*-Gentherapie.

Der idealisierte Vektor sollte eine zellspezifische *in vivo*-Anwendung erlauben, sicher in das Genom der Zielzelle integriert werden, um so an die Tochterzellen weitergegeben zu werden und hierbei die Exzision des defekten Gens mit nachfolgendem Ersatz durch das gesunde Gen ermöglichen. Dabei sollte weder eine antigene noch onkogene Komponente wirksam und die lediglich einmalige therapeutische Applikation gewährleisten sein. Um das genetische Material in die Wirtszellen einzuschleusen stehen prinzipiell nicht virale und virale Vektoren zur Verfügung, welche spezielle Vor- und Nachteile bergen und die voranstehend erwähnten Kriterien bislang leider nicht erfüllen können. Zu den nicht viralen Gentransfermethoden zählen chemische Vorgänge wie die DNA-Komplexierung mit Calciumphosphat und physikalische Verfahren wie die Mikroinjektion, die Lipofektion, die direkte DNA-Einschleusung und der rezeptorvermittelte Gentransfer (targeting) [5, 10]. Der Hauptvorteil der physikalischen Methoden ist, dass kein Cotransfer von unerwünschtem genetischem Virusmaterial in die Wirtszellen stattfindet und damit das Risiko einer Replikation infektiöser Viruspartikel entfällt. Zudem besteht keine Einschränkung hinsichtlich des Wirtszellspektrums, so dass ein Gentransfer im Prinzip in alle Zellen erfolgen kann. Nachteilig ist, dass keine stabile Integration der transferierten DNA in das

Genom der Wirtszelle erfolgt, somit ein lysosomaler Abbauprozess der DNA in Gang gesetzt wird, was eine Weitergabe an die Tochtergeneration verhindert. Durch zusätzliche Beeinflussung des lysosomalen Abbaus, z.B. durch Komplexierung des DNA-Protein-Moleküls bei der rezeptorvermittelten Endozytose mit einem inaktivierten Adenovirus, konnte zwar eine deutliche Effizienzsteigerung des Gentransfers herbeigeführt werden, trotzdem liegt nach wie vor eine lediglich transiente Genexpression vor. Dies bedeutet wiederum die Notwendigkeit wiederholter Anwendungen des Applikationsprozesses [2, 3].

Bei den viralen Vektoren handelt es sich um modifizierte Viren, die der Fremd-DNA als Transportvehikel dienen und deren Einsatz wiederum durch spezifische Vor- und Nachteile limitiert wird. Die Liste der als Vektor getesteten Viren ist groß und reicht von Papova- und Vacciniaviren über Adeno- und Adeno-assoziierte Viren bis hin zu Herpesviren und Retroviren verschiedener Spezies. Im folgenden soll lediglich auf die wichtigsten viralen Vektoren eingegangen werden, deren Charakteristika in Tabelle 2 zusammenfassend dargestellt sind.

Retroviren stellen das bislang wohl am besten untersuchte virale Vektorsystem dar [5, 47]. Hierbei handelt es sich um einen RNA-Virus, der in seinen infektiösen Eigenschaften durch Modifikation seines Genoms beschnitten wurde und zwar noch in der Lage ist, die Wirtszelle zu infizieren und die rekombinante genetische Information ins Wirtsgenom zu integrieren, aber nicht mehr in der Lage ist, infektiöse Viruspartikel zu bilden. Da es sich bei Retroviren zudem um Onkoviren handelt, wurde zusätzlich die Exzision der Genabschnitte erforderlich, die für onkogene Eigenschaften kodieren. Anstelle dieser Gene können dann die therapeutischen Gene eingebracht werden. Vorteil der Retroviren ist eine stabile Integration in das Genom der Wirtszelle mit einer Weitergabe der veränderten genetischen Information an die Tochtergeneration und eine hierdurch bedingte langfristige Expression der Genprodukte. Darüber hinaus wird durch die Entfernung antigen wirkender Viruskomponenten die Wahrscheinlichkeit einer Immunantwort des Wirtsorganismus deutlich reduziert. Limitierungen in der Anwendung erfährt dieses Vektorsystem jedoch dadurch, dass Retroviren lediglich ins Genom teilungsfähiger Zellen integrieren können, da sie von deren Fähigkeit zur DNA-Synthese abhängig sind. Dies bedeutet eine deutliche Einschränkung hinsichtlich des Wirtszellspektrums, da die meisten Zellen und Gewebe, die es durch Gentransfer zu beeinflussen gilt, Zellen sind, die sich nur noch selten teilen, so z.B. Hepatozyten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen der Gefäßwände. Genauso ist die Transfektionsrate postmitotischer Zellen wie Neuronen oder peripherer Zellen nur gering. Eine Möglichkeit die Transfektionsrate zu erhöhen ist, den Gentransfer *ex vivo* durchzuführen, was wiederum die Gewinnung entsprechender Zielzellen aus

dem Patientenkörper erforderlich macht. Nachteilig ist weiterhin, dass die Integration des rekombinanten genetischen Materials semizufällig erfolgt, so dass prinzipiell auch eine Integration in normale Genabschnitte des Wirtsgenoms erfolgen kann, was zu einer gestörten Expression ansonsten gesunder Gene führen könnte. So könnte z.B. die Insertion in der Nähe eines Tumorsuppressorgens dessen Expression verändern und eine Tumorentstehung begünstigen.

Charakteristika	Retrovirus	Adenovirus	Adeno-assoziiertes Virus
Wildtypvirus	Einzelsträngige RNA, 9.2 kb	Doppelsträngige DNA, 36 kb	Einzelsträngige DNA, 5 kb
Insertionsgröße	8 kb	7.5 kb	4.5 kb
Titer (colony forming units/ml)	10^6 - 10^7	10^8 - 10^{10}	10^6 - 10^8
Zielzellen	Nur teilungsfähige Zellen	Teilungsfähige und nicht teilungsfähige Zellen	Teilungsfähige und nicht teilungsfähige Zellen
Genexpressionsdauer	Langfristig	Transient	Transient bis langfristig
Genexpressionsausmaß	Mäßig	Hoch	Mäßig
Mögliche Hürden	Mutationen nach Insertion	Immunantwort des Wirtes	Toxizität viraler Proteine, Mutationen nach Insertion
Mögliche Wirtsimmunität	Nein	Ja	Ja
Replikationskompetent	Nein	Eventuell	Ja
Virale Proteinexpression	Nein	Ja	Nein

Tabelle 2: Charakteristika der wichtigsten momentan erhältlichen Vektoren [5, 117, 121].

Ein weiteres gut untersuchtes Vektorsystem beruht auf modifizierten Adenoviren [5, 117, 121]. Diese sind DNA-Viren, die trotz ihrer Größe und ihres relativ komplexen Aufbaus mittlerweile erfolgreich hergestellt werden können. Der adenovirale Lebenszyklus findet in vier Schritten statt. Die virale Infektion erfolgt durch rezeptorvermittelte Aufnahme in die Zielzelle, wo im Zytoplasma der rekombinante DNA-Kern durch virale Proteasen freigelegt wird und die DNA nachfolgend in den Nukleus der Wirtszelle gelangt. Hier finden dann zwei frühe Transkriptionsphasen statt, die der erst sechs bis acht Stunden später beginnenden DNA-Replikation vorausgehen. Die Initiierung der frühen Transkriptionsphasen hängt hierbei im

Wesentlichen von dem Frühe-Phase-Gen E1A ab, so dass durch Deletion der E1-Region im adenoviralen Genom ein replikationsdefizienter Vektor hergestellt werden konnte, der anstelle der E1-Region ein therapeutisches Gen tragen kann. Eine Vermehrung dieses Virus ist dann nur noch in Gegenwart von Helferzellen möglich, in welche die E1-Region integriert wurde (siehe Abbildung 2) [5, 121].

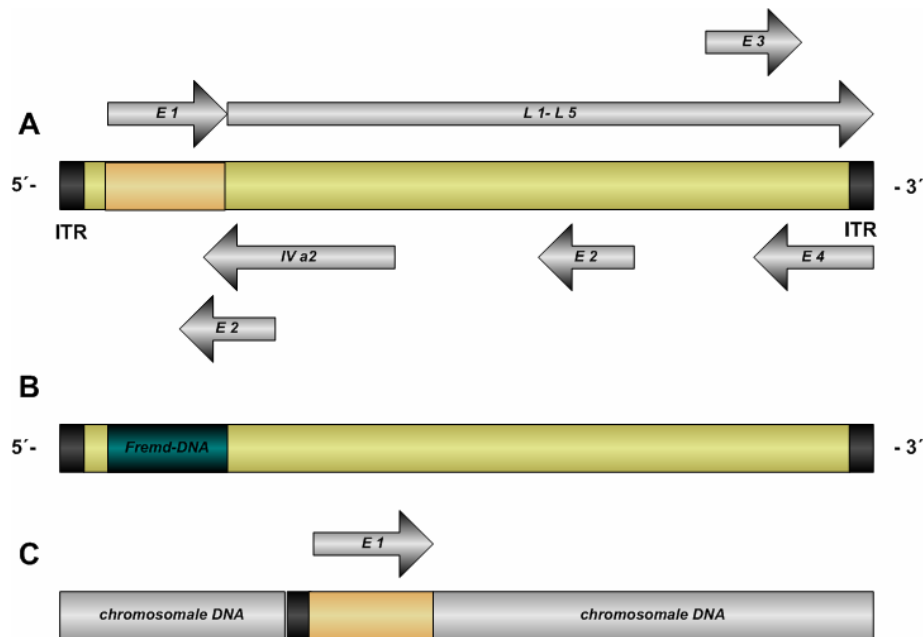


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung eines adenoviralen Gentransfersystems. **A:** Wildtypgenom eines Adenovirus; charakteristisch sind die überlappenden Gensequenzen, welche die Produktion eines nicht antigen wirkenden Vektors erschweren; die frühen Gene (E1- E4) codieren für Enzyme und regulatorische Proteine, die späten Proteine (L1- L5 und IVa2) für Strukturproteine. Die invertierten Regionen (ITR = inverted terminal repeat) enthalten Elemente, die für Replikation und Verpackung des Genoms bedeutsam sind. **B:** Adenoviraler Vektor, wo nach Deletion der E1-Region Fremd-DNA integriert wurde. **C:** Durch die Deletion der E1-Region ist der Vektor nicht mehr in der Lage, sich unabhängig zu vermehren; hierzu ist er auf die Präsenz von Helferzellen angewiesen, in welche der E1-Genabschnitt integriert wurde (modifiziert nach [2] und [6]).

Vorteil der adenoviralen Vektoren ist die Fähigkeit zur Infizierung auch ruhender oder sich langsam teilender Zellen, woraus ein großes potentiellles Wirtszellspektrum resultiert. Darüber hinaus ist die Transfektionsrate der Wirtszellen außerordentlich hoch, und es können hohe Virustiter erzeugt werden, so dass sich dieser Virus insbesondere für *in vivo*-Gentransfermethoden eignet. Nachteilig wirkt sich jedoch aus, dass die adenoviralen Gensequenzen nicht ins Genom der Wirtszelle integriert werden, so dass keine Vererbung der veränderten genetischen Information möglich ist und der Effekt mit der Zellteilung verloren

geht. Das erklärt, dass die Expressionsprodukte der rekombinanten Gene nur transient nachgewiesen werden können. Dies macht den Einsatz bei chronischen metabolischen Störungen z.B. fragwürdig, ein potentiell Einsatzgebiet dieser Methode wären eher Krankheiten, die eventuell mit einer einmaligen therapeutischen Gabe auskommen, z.B. Krebserkrankungen. Komplizierend kommt hinzu, dass bei der Modifizierung der Viren nicht alle antigen wirkenden viralen Gensequenzen exzidiert werden können, da die virale DNA zum Teil starke Überlappungen ihrer Gensequenzen aufweist. Bedingt hierdurch kommt es zu einer Immunantwort des Wirtsorganismus mit Aktivierung zytotoxischer T-Zellen oder der Bildung neutralisierender Antikörper. Gerade der letzte Punkt spielt beim Einsatz der adenoviralen Vektoren eine limitierende Rolle, da Adenoviren humanpathogene Viren sind und der Mensch im Laufe seines Lebens häufig Infektionen hiermit durchmacht, insbesondere Infektionen der oberen Atemwege, was eine Durchseuchung der Bevölkerung mit präformierten Antikörpern bedeutet. Bislang sind 49 humane Serotypen bekannt, welche nach ihrer Gewebsspezifität und Virulenz in sechs Gruppen eingeteilt werden [121]. Einen Überblick über die wichtigsten humanpathogenen Adenoviren gibt Tabelle 3.

Erkrankung	Adenovirusserotypen
Obere Atemwegsinfekte und atypische Pneumonien	1- 7, 14, 21
Pharyngokonjunktivalfieber	3, 7
Keratokonjunktivitis	8, 11, 19, 37
Meningitis	3, 5, 6, 7, 7a, 12
Gastroenteritis	40, 41
Hepatitis	1, 2, 5

Tabelle 3: Serotypen verschiedener humanpathogener Adenoviren [6-8].

Ein weiteres virales Vektorsystem beruht auf Adeno-assoziierten Viren [5]. Hierbei handelt es sich um kleine, nicht humanpathogene DNA-Viren, die sich in den Wirtszellen nur in Anwesenheit eines Hilfsvirus (Adenoviren oder Herpesviren) replizieren können. Dafür erfolgt eine Integration des Virusgenoms in die Wirtszell-DNA, wobei hier insbesondere eine bestimmte Region auf dem Chromosom 19 bevorzugt wird. Hierdurch wiederum wird das oben beschriebene Mutationsrisiko semizufälliger Insertionen reduziert. Nachteilig in der Anwendung dieser Vektoren ist die Notwendigkeit der Applikation der Helferviren, was erneut eine

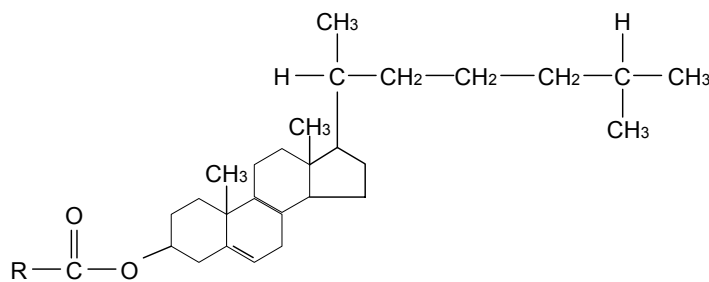
Immunantwort des Wirtsorganismus zur Folge haben kann. Darüber hinaus ist die Insertionsgröße des therapeutischen genetischen Materials aufgrund der ohnehin geringen Größe des Virus deutlich limitiert und die Transfektionsrate nur mäßig. Zudem können keine überragend hohen Virustiter erreicht werden, und es existieren Restriktionen bezüglich der möglichen Zielzellen, was den Einsatz dieses Vektorsystems bislang auf *ex vivo*-Gentransfermethoden begrenzt [9].

1.2 Lipidstoffwechsel

1.2.1 Lipide

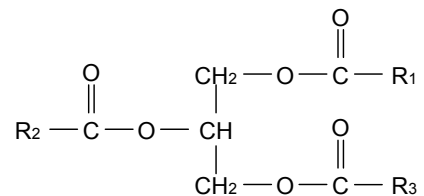
Lipide bezeichnen eine heterogene Gruppe natürlicher Substanzen mit unterschiedlicher chemischer Struktur. Sie kommen im menschlichen Körper als Serumlipide, Strukturelemente der Zellmembran, Substrate für die Synthese von Hormonen oder als Depotfett vor und können anhand ihrer Verbindungsklassen in einfache und komplexe Lipide oder nach ihrem Verhalten in wässrigen Medien in hydrophobe und amphiphile Lipide eingeteilt werden (siehe Abbildung 3). Da sie überwiegend lipophile Gruppen enthalten, sind sie gut löslich in organischen Lösungsmitteln wie z.B. Ether, nicht aber in Wasser. Daher müssen im wässrigen Medium Blut spezielle Transportmechanismen existieren. So bilden einige Lipide kolloidale und mizellare Lösungen, für andere hingegen gibt es spezielle Transportproteine. Die polaren Lipide (z.B. freie Fettsäuren) werden hierbei häufig an verhältnismäßig kleine Proteine wie z.B. Albumin oder an spezielle Transportproteine gebunden, so z.B. Retinol [12].

Nicht polare (hydrophobe) Lipide



Cholesterinester

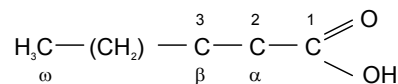
Transportform des Cholesterins



**Triacylglycerol
(Triglyzeride)**

Energieversorgung

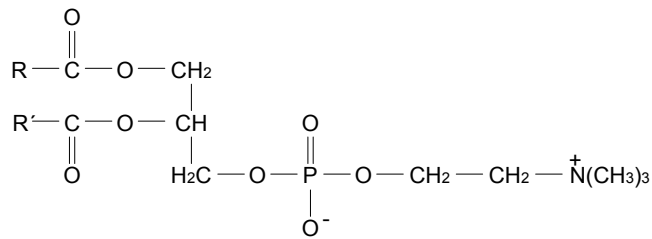
Polare (amphiphile) Lipide



Freie Fettsäuren

z.B. Ölsäure, Palmitinsäure, Linolsäure

*Bausteine zusammengesetzter Lipide,
Energieversorgung*

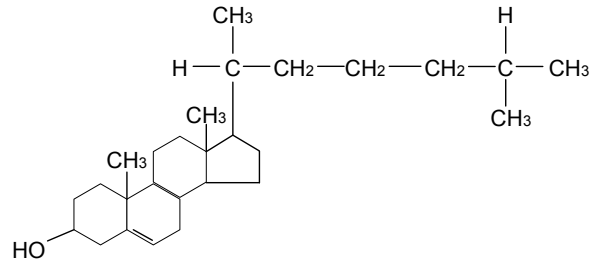


Lecithin (Phospholipid)

Weitere Phospholipide:

- Sphingomyelin
- Lysolecithin
- Phosphatidyl-Ethanolamin
- Phosphatidyl-Serin

Lösungsvermittler, Oberflächenlipide



Cholesterin

*Bausteine von Zellmembranen,
metabolische Vorstufe von
Gallensäuren und Steroidhormonen*

Vitamine (A, K, E, D)

Fettlösliche Vitamine, ohne Abbildung

u.a. Antioxidantien

Abbildung 3: Lipidklassen des Blutplasmas, darunter *kursiv* die jeweilige Funktion (modifiziert nach [12, 13]).

1.2.2 Lipoproteine

Die nicht polaren Lipide hingegen werden in wesentlich größeren amphiphilen Komplexen, den Lipoproteinen, transportiert. Aufgabe der Lipoproteine ist die Aufnahme, der Transport und die Verstoffwechselung der Nahrungsfette und des Cholesterins. Hierbei handelt es sich um in ihrer Zusammensetzung und Struktur variable Konstrukte aus Cholesterin, Cholesterinestern, Phospholipiden, Triglyzeriden und Apolipoproteinen [11, 15, 22, 101]. Sie bestehen aus einem hydrophoben Kern (Cholesterinester, Triglyzeride) und einer diesen umhüllenden polaren monomolekularen Schicht aus Cholesterin, Phospholipiden und Apolipoproteinen (Abbildung 4).

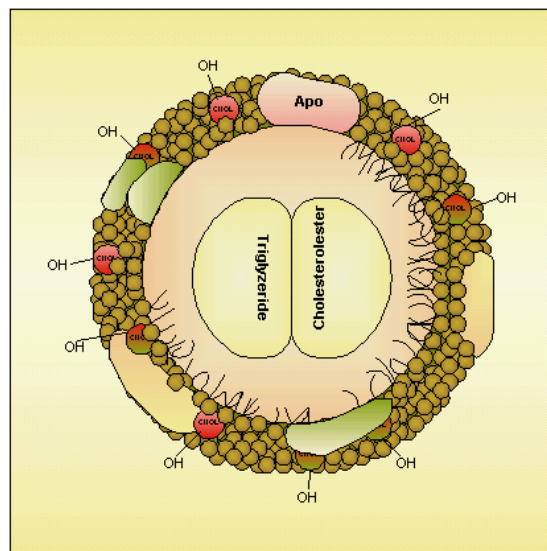


Abbildung 4: Strukturmodell eines LDL-Lipoproteins, Durchmesser 20-25 nm. Die Oberfläche des kugelförmigen Partikels besteht aus einer Einzelschicht von Phospholipiden und Cholesterin, in die ein einziges Molekül des hydrophoben Apoproteins Apo B eingebettet ist. Der LDL-Kern ist außerordentlich hydrophob und besteht vornehmlich aus Cholesterinestern mit langkettigen Fettsäuren (modifiziert nach [10, 11, 14, 15]).

Zur Klassifizierung der Plasmalipoproteine werden verschiedene Kriterien herangezogen, so die mittels Gelfiltration nachweisbare unterschiedliche Größe, die Oberflächenladung und die damit verbundene elektrophoretische Wanderung, die verschiedene Dichte in der Ultrazentrifugation, die Löslichkeit sowie einige spezielle Oberflächeneigenschaften, die z.B. die Präzipitation beeinflussen. Durch Trennung mittels Ultrazentrifugation können hierbei fünf verschiedene Hauptklassen unterschieden werden: Chylomikronen (CM), Very Low Density- (VLDL), Intermediate Density- (IDL), Low Density- (LDL) und High Density- (HDL) Lipoproteine, die

ihrerseits in Subklassen unterteilt werden. Einen Überblick über Einteilung und Eigenschaften geben die Tabellen 4 und 5 [10, 11, 13, 15, 22, 95, 101].

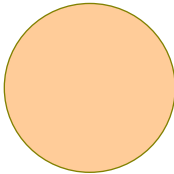
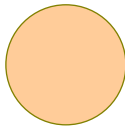
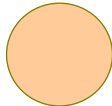
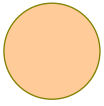







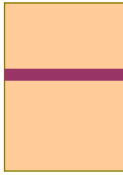
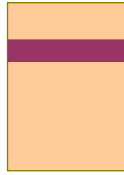

	CM	VLDL	IDL	LDL	HDL	
					HDL ₂	HDL ₃
Größe (nm) und Form	80-1200 	28-80 	25-30 	19-25 	8-11	6-9
						
Dichte-bereich (g/ml)	0,95	<1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,125	1,125-1,21
Zusammensetzung (%)						
	■Triglyzeride ■Cholesterinester ■Cholesterin □Phospholipide ■Apolipoproteine					
Apolipo-proteine A-I	33	-	-	-	65	62
A-II	-	-	-	-	10-23	
A-IV	14	-	-	-	Spuren	-
B-48	5-8	-	-	-	-	-
B-100	-	30-40	60-80	95	-	-
C	32	40-50	10-20	Spuren	10-15	5
E	10	15	10-15	Spuren	3	1
Elektro-phorese	➡ 	➡ 	broad-β-Lipoproteine (floating pre-β)	➡ 	➡ 	
	Chylomikronen (verbleiben an Auftragsstelle)	Prä-β-Lipoproteine		β- Lipoproteine	α-Lipoproteine	

Tabelle 4: Einteilung und Eigenschaften der Serumlipoproteine (modifiziert nach [10, 11, 101]).

Dichteklasse	Subklasse	Dichte [g/ml]
VLDL		<1,006
LDL		1,006-1,063
	LDL ₁	1,006-1,019
	LDL ₂	1,019-1,063
HDL		1,063-1,21
	HDL ₂	1,063-1,125
	HDL _{2a}	1,100-1,125
	HDL _{2b}	1,063-1,100
	HDL ₃	1,125-1,21
	HDL _{3L}	1,140 (Maximum)
	HDL _{3D}	1,160 (Maximum)

Tabelle 5: Dichteklassen der Lipoproteine [11].

1.2.3 Apolipoproteine

Apolipoproteine sind die Proteinkomponenten der Lipoproteine, die nach immunologischen Eigenschaften, Aminosäuresequenz und Kohlenhydratanteil differenziert werden können. Neben den strukturellen Funktionen innerhalb der Lipoproteinpartikel dienen sie als Liganden für spezifische, innerhalb der Plasmamembran lokalisierte Lipoproteinrezeptoren und fungieren als Effektoren von Enzymen des intravasalen Lipoproteinstoffwechsels [10, 11, 102]. Tabelle 6 gibt hierbei einen Überblick über Eigenschaften, Vorkommen, Funktion und Konzentration der Plasmalipoproteine.

Während die Proteinkomponente des LDL zu 95 % durch Apo B gestellt wird, finden sich in den anderen Dichteklassen komplexe Apolipoproteinmuster. Da ein sehr rascher Austausch der Apolipoproteine A1, A2, C1, C2 und C3 zwischen den Chylomikronen, VLDL, IDL und HDL nachzuweisen ist, sind exakte Angaben über ihre jeweilige Verteilung schwer zu erhalten. Diese natürlichen Austauschprozesse führen dazu, dass die in der Leber und dem Intestinum gebildeten nascenten Formen schnell ihre ursprüngliche Zusammensetzung ändern und in die eigentlichen Plasmalipoproteine übergehen.

Apolipo-protein	Dichteklasse	Masse (kDa)	Funktion
A-I	HDL	28	Strukturprotein, LCAT-Aktivierung, Bindung an HDL-Rezeptoren
A-II	HDL	17	Aktivierung der hepatischen Lipase ?
A-IV	CM, HDL	46	Triglyzeridstoffwechsel, LCAT-Aktivierung
B 100	VLDL, LDL	550	Sekretion von Triglyzeriden und Cholesterin, Strukturprotein, Bindung an B/E-Rezeptoren, Aktivierung der Lysolecithin-Acyltransferase
B 48	CM, VLDL	265	Resorption von Lipiden und lipidlöslichen Vitaminen aus der Nahrung
C-I	CM, VLDL	6,5	Unterdrückung der Bindung naszierender Lipoproteine an den B/E-Rezeptor und an LRP, LCAT-Aktivierung
C-II	CM, VLDL	8,8	Aktivierung der Lipoproteinlipase
C-III	CM, VLDL	8,9	Inhibierung der Lipoproteinlipase und Interferenz mit Lipoproteinen an Leberrezeptoren
D (A-III)	HDL ₃	29	LCAT-Aktivierung und –Stabilisierung
E	CM, VLDL	34	Ligand für den B/E-Rezeptor sowie E-Rezeptor, Ausschleusung von Cholesterin aus peripheren Zellen
F	HDL	30	Unbekannt
G	VLDL	72	Unbekannt
H	CM, d>1,21 kg/l	55	Unbekannt
(a)	Lp(a)	350-900 (variabel)	Unbekannte Funktion in Blutgerinnung und Fibrinolyse
J	HDL ₂ , HDL ₃	70	Unbekannt

Tabelle 6: Vorkommen und Funktion der Apolipoproteine [13, 95, 102].

1.2.4 Stoffwechsel der Lipoproteine

Hauptsyntheseorte der Lipoproteine sind Intestinum und Leber, die in Anbetracht ihrer unterschiedlichen Aufgaben im Lipidstoffwechsel und –transfer jeweils ein eigenes Spektrum an Lipoproteinen synthetisieren [10-12, 15, 22, 96]. Da das Intestinum vorwiegend die mit der Nahrung zugeführten Lipide zu verarbeiten hat und die Leber Lipoproteine aus körpereigenen Lipiden aufbaut, die zum Teil aus der Peripherie (z.B. Fettgewebe) und zum Teil aus dem Katabolismus von Lipoproteinen stammen, unterscheidet man einen exogenen und einen endogenen Weg des Lipoproteinstoffwechsels.

Hierbei beschreibt der exogene Weg die intestinale Lipoproteinsynthese, wobei es nach Mahlzeiten in der Dünndarmmukosa zur Bildung triglyzeridreicher Chylomikronen kommt. Diese gelangen über die Lymphe ins Blut, wo sie vorzugsweise in den Kapillaren des Fettgewebes sowie des Skelett- und Herzmuskels sehr schnell wieder abgebaut werden. Im Rahmen des bereits beschriebenen ständigen Austauschs von Apolipoproteinen nehmen die Chylomikronen von den HDL auch das Apoprotein C2 auf, welches als Aktivator der Lipoproteinlipase (LPL) wirkt. Dieses Enzym hydrolysiert die Triglyzeride der Chylomikronen zu freien Fettsäuren, welche entweder – nach neuerlicher Veresterung - im Fettgewebe gespeichert werden oder an Albumin gebunden auf dem Blutweg weitertransportiert werden, übrigbleibende Partikel werden von der Leber abgefangen und ganz abgebaut. Durch den Abbau der Chylomikronen entstehen die sogenannten Chylomikronen-Remnants (CM-R), die an Dichte zu- und an Größe abnehmen und nur noch 5% der ursprünglichen Partikelmasse ausmachen. Da während der Umbauprozesse auch das Apoprotein C verloren geht, werden die Remnants nicht mehr weiter durch die LPL abgebaut, sondern werden zur Leber transportiert und hier über spezifische Apo E-Rezeptoren aufgenommen (siehe Abbildung 5) [96, 100].

Der endogene Weg beschreibt die hepatische Lipoproteinproduktion und hierbei im wesentlichen die VLDL-Synthese und –Metabolisierung [100]. In der Leber werden aus körpereigenen Lipiden und Apolipoproteinen die VLDL gebildet, welche mit einem Triglyzeridgehalt von ca. 60% den wesentlichen intravasalen Carrier für endogene Triglyzeride darstellen. Nach der Abgabe in die Blutbahn werden auch diese rasch verstoffwechselt, indem sie durch Aufnahme der Apoproteine E und C die LPL aktivieren und hierdurch die Triglyzeride zu Di- und Monoacylglycerolen sowie freien Fettsäuren hydrolysiert werden. Dieser intravasale enzymatische Abbau der VLDL geht erneut mit einem regen Austausch seiner Bestandteile einher, der Gehalt der einzelnen Partikel ändert sich ständig, lediglich der Gehalt des Apoprotein B bleibt konstant, da dieses nicht abgegeben wird. Über mehrere Zwischenstufen kommt es so zur Entstehung von VLDL-Remnants, den sogenannten IDL, welche wiederum unter Einfluß der hepatischen Triglyzeridlipase (HTGL) in die cholesterolreichen LDL umgewandelt werden. Diese gelangen per Blutstrom zur Leber und in die Peripherie, wo sie an den hochaffinen LDL-Rezeptor binden, ein integrales Membranprotein der Zielzellen, und zu 80% mittels rezeptorvermittelter Endozytose aufgenommen werden, ein kleinerer Teil wird über rezeptorunabhängige Wege eliminiert. Intrazellulär wird das Cholesterin durch lysosomale Hydroxylasen aus den endozytotischen LDL-Vesikeln freigesetzt und seiner eigentlichen

Funktion, z.B. dem Zellmembranaufbau, zugeführt, überschüssiges Cholesterin wird nach erneuter Veresterung durch die Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) gespeichert.

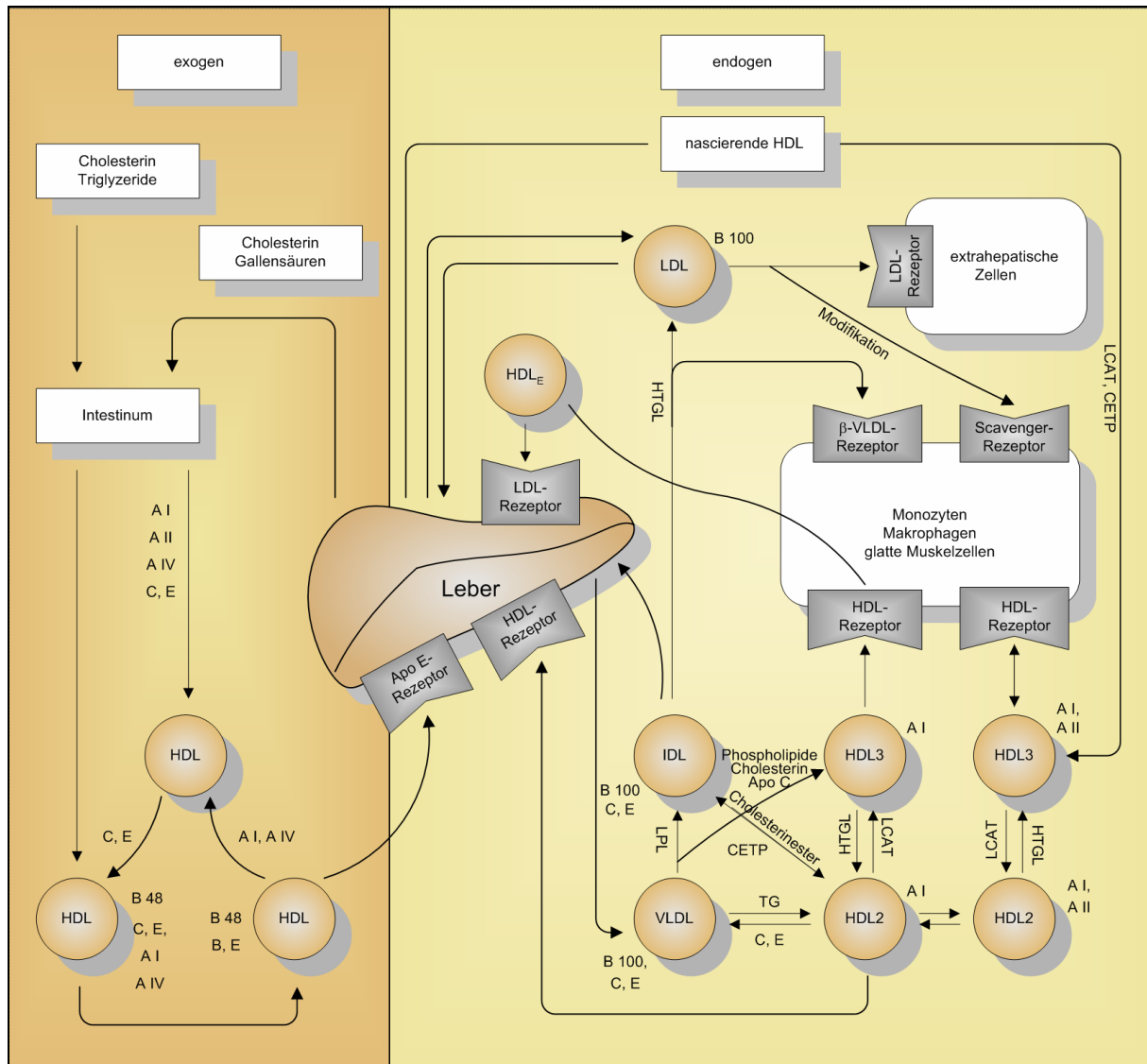


Abbildung 5: Stoffwechsel der Plasmalipoproteine. Dargestellt sind exogenes, endogenes und reverses Cholesterintransportsystem (modifiziert nach [13]).

Der Rücktransport des Cholesterins aus den peripheren Geweben zur Leber (reverser Cholesterintransport) wird durch die in Darm und Leber produzierten HDL-Partikel gewährleistet. Die nascenten Formen haben zunächst eine discoidale Form, erst nach der Aufnahme von Phospholipiden, Cholesterin sowie den Apoproteinen C und E aus den Chylomikronen und VLDL nehmen die reifen Partikel eine sphärische Form an. Hierbei sind die HDL auch in der Lage, Cholesterin aus den arteriosklerotischen Plaques der Blutgefäße herauszulösen, weshalb ihnen eine antiarteriosklerotische Wirkung zugeschrieben wird. Das Cholesterin wird unter Einfluß der Lecithin-Cholesterol-Acyl-Transferase (LCAT) verestert und

im hydrophoben Kern gespeichert. Nachfolgend werden die HDL-Partikel zur Leber transportiert und aufgenommen, wo das Cholesterol metabolisiert und in Form von Gallensäuren bzw. als freies Cholesterin oder Cholesterinester mit der Galle ausgeschieden wird. Ein anderer Teil des veresterten Cholesterins wird unter Vermittlung von Cholesterinester-Transfer-Proteinen (CETP) auf Apo B enthaltende Lipoproteine übertragen, um via LDL in die Leber oder erneut in periphere Gewebe zu gelangen [1, 10- 13].

1.2.5 Stoffwechsel der Low Density Lipoproteine

Die LDL stellen in ihrer Dichteklasse eine heterogene Partikelpopulation dar, die sich in mindestens fünf Subfraktionen unterteilen läßt, die sich in ihrem Katabolismus unterscheiden. Die Halbwertszeit beim gesunden Probanden beträgt etwa zwei Tage. LDL entstehen intravasal durch den Umbau von VLDL über die weniger dichten IDL und werden anschließend – im Gegensatz zu den VLDL und HDL – ohne entscheidende Umbauvorgänge als Gesamtpartikel eliminiert [11, 12]. Hierbei kommt der Leber eine zentrale Rolle zu, da sie nicht nur die LDL-Produktion via VLDL-Synthese steuert, sondern auch ca. 60-70% des gesamten LDL-Katabolismus auf sie entfallen. Der Rest wird durch die peripheren Gewebe getragen, wo das Cholesterin zum Aufbau von Zellmembranen sowie zur Synthese von Steroidhormonen und Vitamin D benötigt wird. Die Low Density Lipoproteine werden zu etwa zwei Dritteln über den hochaffinen LDL-Rezeptor eliminiert, der Rest wird durch Makrophagen und histiozytäre Zellen des retikuloendothelialen Systems abgebaut. Dieser als „scavenger pathway“ bezeichnete Abbauweg ist im Gegensatz zum LDL-Rezeptor-abhängigen Katabolismus nicht sättigbar [12, 13, 31, 34]. Ihm liegen auf zellulärer Ebene mehrere Mechanismen zugrunde wie die adsorptive Endozytose über niedrig affine Rezeptoren oder die Pinozytose sowie die Aufnahme von LDL über Rezeptoren, die spezifisch modifizierte LDL erkennen, die sogenannten Scavenger-Rezeptoren [97]. Während die Leber den überwiegenden Teil via LDL-Rezeptor aufnimmt, beschreiten die peripheren LDL-verstoffwechselnden Gewebe ca. zur Hälfte diesen LDL-Rezeptor-unabhängigen Weg [11]. Eine Regulation erfährt der LDL-Abbau durch das Expressionsausmaß des LDL-Rezeptors, da dieses unter anderem auch durch Hormone (Östrogene) oder diätetische Maßnahmen beeinflusst werden kann und eine daraus folgende Down- oder Up-Regulation unmittelbare Auswirkungen auf die Höhe des LDL-Spiegels im Blut hat.

1.2.6 Low Density Lipoprotein-Rezeptor und LDL-Rezeptorzyklus

Der LDL-Rezeptor ist ein integrales Membranglykoprotein, das eine Schlüsselrolle in der Regulation der Cholesterinserumkonzentration spielt und sich in unterschiedlichem Ausmaß auf den meisten Zelltypen nachweisen läßt, besonders hohe Konzentrationen finden sich jedoch auf den Hepatozyten und den Zellen der Nebennierenrinde. Der aus einer einzigen, 839 Aminosäuren langen oligosaccharidhaltigen Peptidkette aufgebaute Rezeptor besteht bei grober Unterteilung aus fünf Domänen, denen jeweils unterschiedliche Funktionen zugeschrieben werden [10, 11, 13, 14] (Abbildung 6).

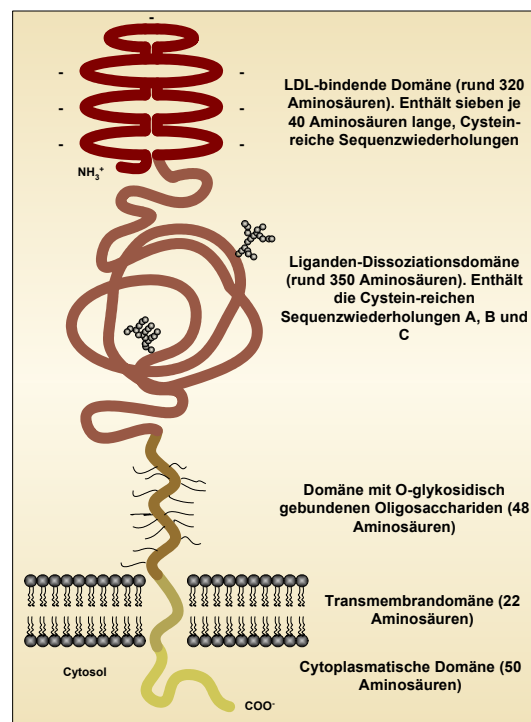


Abbildung 6: Die fünf Domänen des menschlichen LDL-Rezeptors (modifiziert nach [15] und [14]).

Der größte Teil des Proteins liegt hierbei extrazellulär, nur ein kleiner Anteil wird durch die Transmembran- und die zytoplasmatische Domäne gestellt. Die extrazellulär gelegene aminoterminal Domäne fungiert als Bindungsstelle für Apolipoprotein B 100 und Apolipoprotein E. Sie besitzt eine cysteinreiche Sequenz von 40 Resten, die sich, mit geringfügigen Variationen, siebenmal wiederholt und über zahlreiche Disulfid-Bindungen verknüpft ist. Eine Anhäufung negativ geladener Seitenketten, reich an Clustern aus Glutamat und Aspartat, reagiert mit entsprechenden positiv geladenen Regionen des Liganden. Die zweite Domäne zeigt eine 35%-ige Homologie zu einem Teil der Vorstufe des Epidermiswachstumsfaktors und enthält zwei N-gebundene Oligosaccharidketten, ihre Funktion

ist allerdings noch nicht bekannt. Die dritte Domäne ist unmittelbar oberhalb der Plasmamembran lokalisiert und enthält Serin- und Threoninreste, die O-glykosidisch gebundene Zuckerreste tragen. Diese Oligosaccharide wirken möglicherweise als Stabilisatoren, die den Rezeptor von der Membran weggestreckt halten, damit die aminoterminal Domäne den Liganden zugänglich ist. Die vierte Domäne durchspannt mit ihren 22 hydrophoben Aminosäuren die Zellmembran und verankert auf diese Weise den Rezeptor. An sie schließt sich die zytosolseitige Domäne an, welche mit Clathrin in Interaktion tritt und via Ansammlung von Rezeptormolekülen auf der Zelloberfläche die Wechselwirkung des Rezeptors mit den coated pits kontrolliert.

Der LDL-Rezeptor spielt in der Homöostase des Cholesterinstoffwechsels eine Schlüsselrolle. Da er sowohl Apo B als auch Apo E binden kann, wird er auch als B/E-Rezeptor bezeichnet, seine Affinität ist für Apo E allerdings ca. 10-mal höher als für Apo B. Weil Apo E-haltige Lipoproteine jedoch mehrere Apo E enthalten, werden durch einen Partikel gleich mehrere Bindungsstellen abgesättigt, während LDL nur jeweils ein Apo B enthalten und somit gleichzeitig mehrere Partikel gebunden werden können. Dies bedingt eine ca. drei-mal höhere Kapazität des B/E-Rezeptors für LDL gegenüber Apo E-haltigen Lipoproteinen [100].

Die Synthese des Rezeptorproteins findet im rauen endoplasmatischen Retikulum in Form eines Vorläufermoleküls statt, das in Transportvesikeln zum Golgi-Apparat transportiert wird. Hierbei wird durch kontinuierliche Anheftung von Kohlenhydratresten die Modifizierung zum reifen LDL-Rezeptor vollzogen. Dieser wird in sog. coated vesicles zur Zelloberfläche transportiert, wo er ca. 45 Minuten nach Synthesebeginn in die Zellmembran integriert wird. Nach dem Binden spezifischer Apo E- und Apo B-haltiger Liganden sammeln sich die Rezeptoren dann in den sog. coated pits (Stachelsaumgrübchen), welche ihren Namen durch einen käfigartigen Überzug aus multiplen Proteinfilamenten, dem sogenannten Clathrin, erhalten, die an der zytoplasmatischen Zellmembranseite exprimiert werden. Durch Einstülpung und Abschnürung dieser speziellen Zellmembranregion bilden sich coated vesicles aus, die der Internalisierung der LDL-beladenen Rezeptoren dienen, dieser Vorgang wird als rezeptorvermittelte Endozytose bezeichnet. Im Zytoplasma entsteht nach Depolymerisation des Clathrin-Mantels ein Endosom oder uncoated vesicle, das mit einem uncoupling vesicle (Compartment of uncoupling of receptor and ligand = CURL) fusioniert. In diesem wird durch eine ATP-getriebene Protonenpumpe ein schwach saurer pH-Wert um 5,0 hergestellt, wodurch es zu einer Dissoziation des LDL-Partikels vom Rezeptor kommt. Letzterer wird nach Abschnürung eines rezeptorreichen Abschnitts recycelt und zur Zelloberfläche zurückgebracht. Die Dauer so eines Regenerationszyklus beträgt gerade

mal zehn Minuten, so dass der Rezeptor mehrfach verwendet werden kann, bis er nach ca. 20 Stunden Lebensdauer endgültig abgebaut wird. Das LDL-haltige Vesikel fusioniert schließlich mit einem primären Lysosom, wodurch ein großes sekundäres Lysosom entsteht. Der Proteinanteil der LDL wird dort durch Proteasen in Aminosäuren hydrolysiert, während die Cholesterinester der LDL durch eine saure lysosomale Lipase in freies Cholesterin und freie Fettsäuren hydrolysiert werden. Die Fettsäuren werden für die Synthese neuer Phospholipide verwendet, das freie Cholesterin hingegen durchquert nachfolgend die lysosomale Membran mittels passiver Diffusion, um zur Membransynthese genutzt zu werden. Zusätzlich werden durch den Anstieg freien Cholesterins in der Zelle drei regulatorische Schritte des zellulären Cholesterinmetabolismus ausgelöst. Erstens wird durch einen Feed-back-Mechanismus die zelluläre Cholesterinsynthese gebremst, indem die Aktivität des Schrittmacherenzym, der 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-CoA-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), supprimiert wird. Zweitens wird die Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) aktiviert, welche freies Cholesterin und langkettige Fettsäuren reverestert und damit in die Depotform überführt. Drittens kommt es zu einer Unterdrückung der LDL-Rezeptorneusynthese, wodurch die weitere LDL-Aufnahme aus dem Plasma in die Zelle begrenzt wird [12, 14, 15, 22, 98-100].

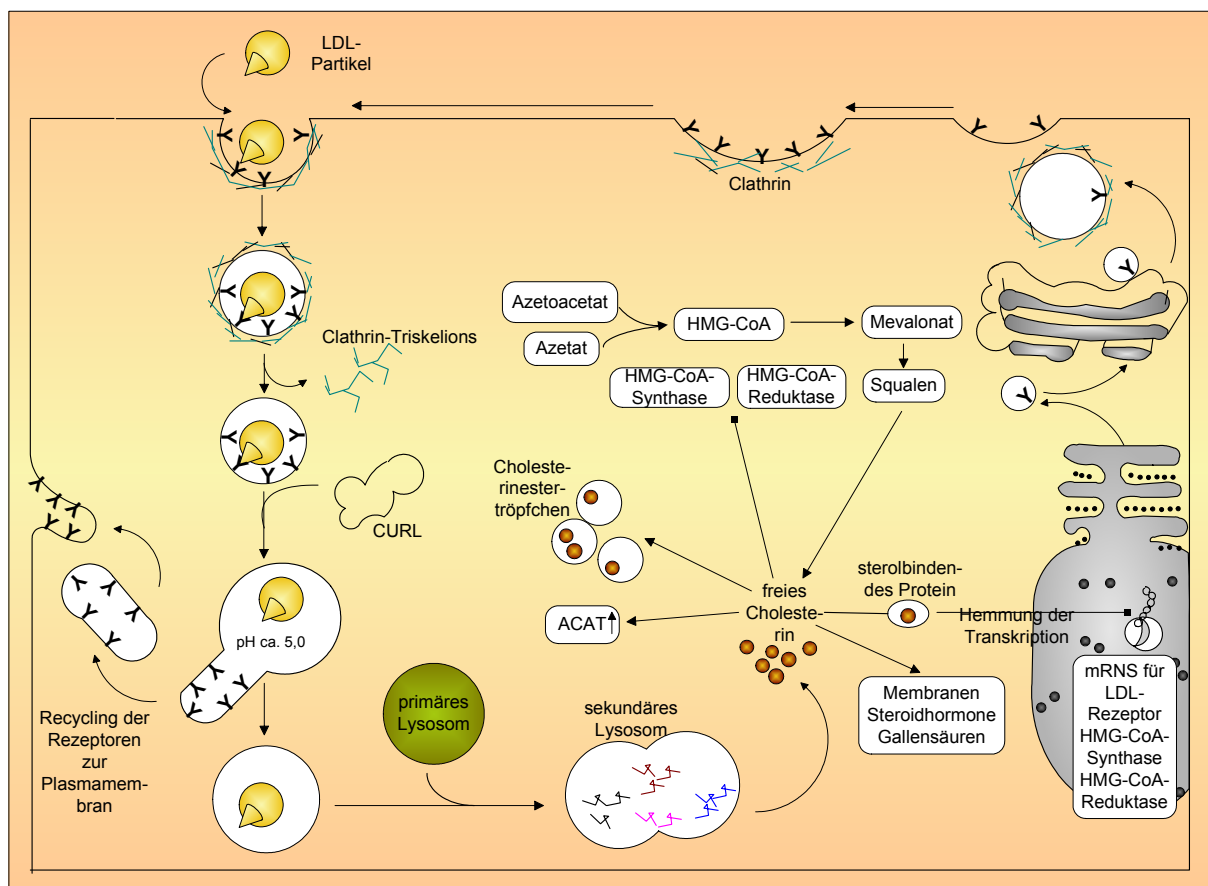


Abbildung 7: Der LDL-Rezeptorzyklus (modifiziert nach [13] und [14]).

1.3 Familiäre Hypercholesterinämie

1.3.1 Geno- und phänotypische Charakteristika der Familiären Hypercholesterinämie

Die autosomal-dominant vererbte Familiäre Hypercholesterinämie (FH) zählt zu den häufigsten monogenetischen Stoffwechselkrankheiten. In ihrer heterozygoten Form kommt sie bei Kaukasiern mit einer Häufigkeit von 1:500 in der Bevölkerung relativ oft vor, während sie in der homozygoten Form mit einer Häufigkeit von 1:1.000.000 weitaus seltener ist [10, 13, 16, 27, 119]. Klinisch ist die Erkrankung durch ein erhöhtes Gesamt- und LDL-Cholesterin, eine Xanthomatose der Sehnen und der Haut sowie eine frühzeitig einsetzende Koronarsklerose gekennzeichnet, wobei der Manifestationszeitpunkt bei der homozygoten Form bereits im Kindesalter liegt. Auch kann es zu wiederkehrenden Oligo- oder Polyarthritiden sowie Tendosynovitiden kommen, welche bei Homozygoten sogar zu Gelenkdeformitäten führen können. Laborchemisch lassen sich bei homozygot Erkrankten LDL-Cholesterinserumkonzentrationen von 400-1.000 mg/dl nachweisen, während diese bei Heterozygoten zwischen 200 und 400 mg/dl liegen, hierbei sind die Triglyzeridserumkonzentrationen typischerweise normal oder allenfalls leicht erhöht [12, 22, 100]. Xanthome der Sehnen und der Haut sind typische äußere Zeichen der Familiären Hypercholesterinämie [13], wobei die Häufigkeit ihres Auftretens sowohl mit der Höhe der Cholesterinserumkonzentration als auch mit dem Alter des Patienten korreliert [21]. Dies bedingt, dass heterozygot erkrankte Patienten nach dem 20. Lebensjahr in 46-95% der Fälle Sehnen- und seltener Hautxanthome aufweisen, Homozygote jedoch bis zum vierten Lebensjahr in nahezu 100%. Sehnenxanthome sind palpatorisch derbe, gegenüber der Sehne nicht verschiebbare Erhabenheiten, die typischerweise im Bereich der Fingerstrecksehnen und der Achillessehne zu finden sind [35]. Die Hautxanthome hingegen sind weiche, halbkugelige, gelbliche und gegenüber der Unterlage verschiebbliche Knoten, die bevorzugt über den Streckseiten der Ellenbogen, in der Glutealregion und über den Kniescheiben zu finden sind. Während die sogenannten planen Xanthome in den Interdigitalfalten nur bei homozygot Erkrankten zu finden sind, sind Xanthelasmen und der Arcus lipoides corneae zwar durchaus häufige klinische Manifestationen bei der FH, jedoch keinesfalls pathognomonisch, prinzipiell können sie sogar bei Patienten mit einer normalen Cholesterinserumkonzentration auftreten.

Dramatischer sind jedoch die atherosklerotischen Gefäßveränderungen, denen FH-Patienten im Bereich der Koronarien und der thorakalen und abdominalen Aorta bereits frühzeitig unterliegen

[13, 34]. Zwar kommt es auch zu entsprechenden Veränderungen an den hirnzuführenden Gefäßen und seltener auch an den peripheren Arterien, klinisch manifeste zerebrale oder gar periphere arterielle Durchblutungsstörungen sind jedoch sehr selten. Limitierend wirkt die Erkrankung durch ihre Veränderungen an den Herzkranzgefäßen, was früh zu einer koronaren Herzerkrankung mit entsprechenden klinischen Manifestationen wie pectanginösen Beschwerden und Myokardinfarkten führt. Homozygote erfahren diese Veränderungen bereits in der Kindheit und entwickeln umschriebene proximale Koronarstenosen sowie valvuläre oder supra-valvuläre Aortenstenosen durch xanthomatöse Ablagerungen im Bereich der Aortenklappe und Aortenwurzel, gelegentlich finden sich auch xanthomatöse Ablagerungen im Bereich der Mitralklappe. Dies wiederum bedingt das frühzeitige Auftreten von Herzinfarkten schon vor dem 10. Lebensjahr sowie den Tod meist vor Erreichen des Erwachsenenalters. Heterozygote entwickeln entsprechende Veränderungen später und schleicher, meist treten die ersten Anzeichen zwischen dem 25. und 45. Lebensjahr auf, wobei Männer auch bei gleich hohen Cholesterinspiegeln häufiger und früher als Frauen betroffen sind [12, 13], was möglicherweise durch eine stärkere Erniedrigung des HDL-Spiegels bedingt ist [26]. Insgesamt ist bei den nur ein krankes Allel aufweisenden Heterozygoten ein wesentlich variables klinisches Krankheitsbild zu beobachten als bei homozygot Erkrankten, welche zwei defekte Allele besitzen.

Die genetische Ursache der FH ist in Mutationen im Bereich des LDL-Rezeptorgens begründet, welche zu entsprechenden Funktionsstörungen des LDL-Rezeptors führen [13, 17-20]. Der Grundstein hierfür wurde durch Brown und Goldstein in den 70er Jahren durch Untersuchungen an kultivierten Fibroblasten homozygot Erkrankter gelegt [22]. Das 45 kb lange humane LDL-Rezeptorgen befindet sich auf dem linken Arm des Chromosoms 19 und beinhaltet 18 Exons und 17 Introns. Mittlerweile sind über 200 verschiedene Mutationen bekannt, welche alle zu einer gestörten LDL-Aufnahme aus dem Plasma und damit zu einer Erhöhung der LDL-Konzentration im Serum führen. Abbildung 8 illustriert die Struktur des LDL-R-Gens mit einigen bekannten Mutationen [10, 13, 30].

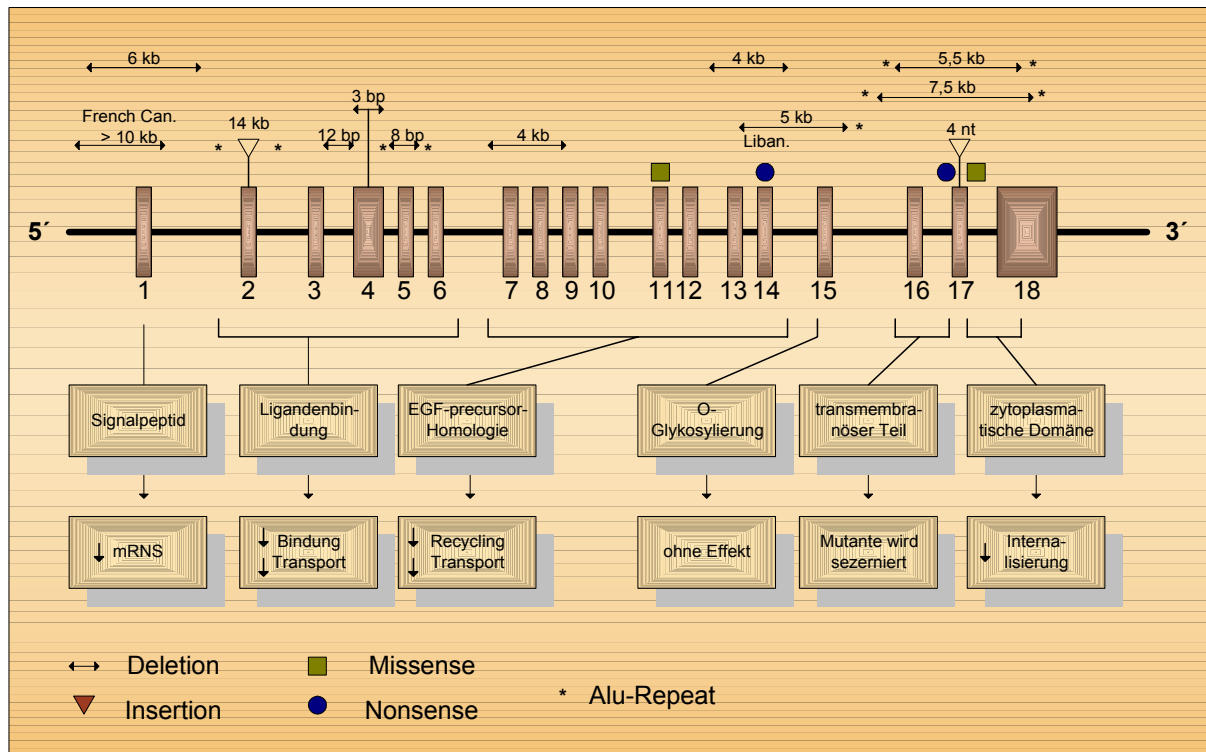


Abbildung 8: Struktur des LDL-Rezeptor-Gens mit einigen bekannten Mutationen [13].

Molekularbiologische Untersuchungen an einer großen Zahl homozygoter Patienten führten wiederum zu einer Zuordnung dieser Mutationen zu bislang fünf Klassen, wobei viele LDL-Rezeptorallele mehreren Klassen gleichzeitig angehören [13, 22]: Bei **Klasse 1-Mutationen** wird von dem defekten Gen kein Rezeptor oder nur eine sehr geringe Menge gebildet. Die am häufigsten vorkommenden **Klasse 2-Mutationen** führen zur Bildung eines transport-defizienten Rezeptors, dessen intrazelluläre Weiterleitung entweder stark verlangsamt abläuft, so dass nur wenige Rezeptoren verspätet die Zelloberfläche erreichen (**Typ 2b**) oder dessen Transport auf der Ebene des Vorläufermoleküls zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat blockiert wird, so dass es gar nicht erst zur Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche kommt (**Typ 2a**). Zwar laufen die bislang beschriebenen Schritte bei den **Klasse 3-Mutationen** regelrecht ab, d. h. es kommt zum Erscheinen des Rezeptors auf der Zelloberfläche, dafür kann dieser jedoch keinen Liganden binden. Als auslösend sind hier Mutationen zu sehen, welche die cysteinreiche LDL-Bindungsdomäne oder die Epidermiswachstumsfaktor-Präkursor-homologe Domäne betreffen. Bei den am seltensten vorkommenden **Klasse 4-Mutationen** kommt es hingegen zu einer komplikationslosen Prozession des Rezeptors an die Zelloberfläche und auch zu einer regelrechten Ligandenbindung, allerdings unterbleibt die für die Internalisierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes zwingend notwendige Ansammlung in coated pits, welches die Aufnahme in die

Zelle verhindert. Die **Klasse 5-Mutationen** schließlich beschreiben einen Rezeptor, der bezüglich Transport, Ligandenbindung und Internalisierung ein regelrechtes Verhalten zeigt, jedoch unterbleibt nachfolgend die Ablösung des LDL im Endosom, so dass kein Recycling des LDL-Rezeptors stattfindet.

Die beschriebenen Defekte führen bei Patienten mit FH sowohl zu einem gestörten LDL-Abbau als auch zu einer erhöhten LDL-Synthese, was durch die duale Rolle des LDL-Rezeptors bedingt ist [28, 29, 23-25]. LDL entsteht als Abbauprodukt der von der Leber sezernierten VLDL, wobei als Intermediärprodukt die sog. IDL entstehen. Diese Apo E-haltigen Partikel werden etwa zur Hälfte von den LDL-Rezeptoren abgebaut und auch bei normaler Rezeptorfunktion verbleibt ein Teil im Plasma, wo er zu den LDL hydrolysiert wird, die ebenfalls durch den membranständigen Rezeptor gebunden werden. Der Rezeptor übernimmt beim Stoffwechselgesunden also eine duale Rolle, indem er zum einen die LDL-Produktion durch Eliminierung des LDL-Vorläufers IDL aus der Blutbahn senkt und zum anderen den LDL-Abbau durch rezeptorvermittelte Endozytose anstößt. Die fehlende IDL-Aufnahme und die gestörte LDL-Aufnahme in die Zelle bei der FH bedingen nun eine Erhöhung der LDL-Serumkonzentration zum einen durch eine vermehrte LDL-Produktion aus IDL, zum anderen durch LDL-Retention in der Blutbahn und eine Ankurbelung der zelleigenen Cholesterinsynthese. Bezüglich des katabolen Defekts konnten *in vivo*-Stoffwechselstudien zeigen, dass das LDL bei heterozygoten FH-Patienten etwa 50% langsamer abgebaut wird als bei Stoffwechselgesunden, Homozygote benötigen hierfür sogar ca. drei-mal so lange [23]. Dies bedingt, dass dem LDL-Abbau über die in Kapitel 1.2.5 beschriebenen LDL-Rezeptor-unabhängigen Wege bei FH-Patienten eine vergleichsweise größere Bedeutung zukommt, bei Homozygoten ohne Rezeptoraktivität sind sie sogar komplett für den LDL-Abbau zuständig [31]. Da diese Abbauege jedoch nicht sättigbar sind und sie auch keine Supprimierung der zellständigen Cholesterinsynthese hervorrufen, führt eine erhöhte Plasma-LDL-Konzentration zu einer Cholesterinretention in den sog. Scavengerzellen. Die auf diese Weise lipidüberladenen Zellen degenerieren zu Schaumzellen, die ihrerseits als wesentliche Bestandteile atherosklerotischer Frühläsionen anzusehen sind.

Allgemein kann man sagen, dass Mutationen, die lediglich zu einer beeinträchtigten Rezeptorfunktion führen, niedrigere Cholesterinwerte und einen milderen klinischen Verlauf mit besserem Ansprechen auf eine medikamentöse Therapie bedingen als Mutationen, die zu einem totalen Funktionsverlust des Rezeptors führen [51, 52, 120]. Eine völlige Korrelation zwischen Mutationstyp und Schweregrad der Erkrankung ist aber nicht immer gegeben. So konnten selbst bei Patienten mit identischen Mutationen innerhalb einer Familie deutlich unterschiedliche

klinische Verläufe beobachtet werden; hierfür ist vermutlich der Einfluß anderer auf den Fettstoffwechsel wirkender Gene verantwortlich [24, 25].

1.3.2 Konventionelle Therapie der Familiären Hypercholesterinämie

Grundstein der Therapie bei der FH ist eine generell fettreduzierte Diät, welche insbesondere arm an Cholesterin (<220 mg/die) und gesättigten Fetten (< 10% des Kalorienanteils) sein und bevorzugt mehrfach ungesättigte Fettsäuren (> 10% des Kalorienanteils) enthalten sollte [36, 38]. Leider reichen diätetische Maßnahmen allein meistens nicht aus, um die Serumcholesterinkonzentration ausreichend zu senken, so dass zusätzliche medikamentöse Maßnahmen notwendig werden. Neben Anionenaustauscherharzen, Fibraten, Nikotinsäure und ihren Derivaten, β -Sitosterin und Probucol werden hier insbesondere in den letzten Jahren zunehmend HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren eingesetzt, auch Kombinationen sind möglich, wobei sich vor allem Kombinationen mit Statinen als besonders effektiv erwiesen haben [22, 37, 39, 119]. Bei heterozygot Erkrankten kann durch diese beiden Maßnahmen oft eine ausreichende Senkung des Gesamt- und LDL-Cholesterins im Serum herbeigeführt werden, bei Homozygoten hingegen reichen diese therapeutischen Möglichkeiten noch nicht aus [13, 44]. In diesen Fällen kann die LDL-Apherese zu einer weiteren Senkung des LDL-Cholesterinspiegels eingesetzt werden. Durch dieses seit den frühen achtziger Jahren in der Regel einmal wöchentlich eingesetzte Verfahren werden selektiv LDL-Partikel, z.B. mittels Immunoabsorption oder dem HELP-Verfahren (heparin-mediated extracorporeal LDL precipitation), aus dem Blut eliminiert. Hierdurch kommt es nachweislich zu einem langsameren Fortschreiten der atherosklerotischen Veränderungen, teilweise konnte sogar eine Regression beobachtet werden [22, 40, 41]. Eine Heilung der Erkrankung ist bislang nur durch eine Lebertransplantation möglich, da hierdurch partiell die fehlenden LDL-Rezeptoren wieder zur Verfügung gestellt werden und die Ansprechbarkeit auf lipidsenkende Medikamente verbessert wird. Eine effektive Cholesterinsenkung über Jahre hinweg ist hierdurch möglich. Da dieses Verfahren jedoch per se mit einer nicht zu vernachlässigenden Morbidität und Mortalität sowie der lebenslangen Einnahme von Immunsuppressiva vergesellschaftet ist, sollte es nur rezeptor-negativen homozygot Erkrankten vorbehalten sein, bei denen eine Ausschöpfung der konservativen Verfahren zu keinem adäquaten Ansprechen geführt hat [22, 34, 42-44, 103, 118, 119]. Die dramatische Cholesterinsenkung durch eine Lebertransplantation unterstreicht den Stellenwert hepatischer LDL-Rezeptoren *in vivo* und unterstützt gentherapeutische Ansätze, welche den Transfer eines normalen LDL-Rezeptorgens in Hepatozyten zum Ziel haben.

1.3.3 Getherapeutische Ansätze der FH im Tiermodell

Watanabe Heritable Hyperlipidemic (WHHL)-Kaninchen stellen ein besonders geeignetes Tiermodell der FH dar, da der Lipoproteinmetabolismus der Kaninchen dem des Menschen relativ ähnlich ist. So leiden auch diese Tiere unter einem LDL-Rezeptordefekt, der mit einer deutlichen Elevation der Serum-LDL-Konzentration vergesellschaftet ist und so eine prämatüre Atherosklerose hervorruft [33, 34, 47, 53-57]. Die Ursache des Defekts ist eine 12 Nukleotide lange in-frame-Deletion des LDL-Rezeptorgens, welche zu einem Verlust von vier Aminosäuren in der Ligandenbindungsdomäne und damit zu einem funktionsunfähigen Genprodukt führt [50, 54]. Geno- und phänotypisch lassen sich bei diesen Tieren deutliche Parallelen zum Verlauf der FH beim Menschen aufzeigen. Bereits innerhalb des ersten Lebensjahres entwickeln sich beim Kaninchen atheromatöse Veränderungen der Aorta, nachfolgend kommt es zur Bildung subkutaner und tendinöser Xanthome und Linsentrübungen sowie einer progredienten Koronarsklerose [34, 47, 53-57]. Insgesamt führen diese Veränderungen in der Regel in den ersten drei Lebensjahren zum Tod des Tieres.

In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche präklinische *ex vivo*- und *in vivo*-Versuchsreihen mit WHHL-Kaninchen im Rahmen getherapeutischer Bemühungen der FH beschrieben. Das Paradigma lieferten Wilson et al. Ende der achtziger Jahre mit einem *ex vivo*-Ansatz, bei welchem WHHL-Kaninchen Hepatozyten entnommen, kultiviert und mit einem rekombinanten Retrovirus transduziert wurden, welcher das Gen für den humanen LDL-Rezeptor enthielt. Nachfolgend wurden die modifizierten Leberzellen den Tieren via Portalvene reimplantiert, was zu einem signifikanten Abfall der Serumcholesterinkonzentration von bis zu 70% für einen Zeitraum von sechs Tagen führte [47-50]. Die Überlegung, dass die nur transiente Genexpression Ausdruck einer Abstoßungsreaktion gegen die allogenen Hepatozyten sein könnte, führte zur Verwendung autologer Leberzellen. So führten Chowdhury et al. 1991 bei einer Reihe von WHHL-Kaninchen partielle Hepatektomien durch und kultivierten die so isolierten Hepatozyten. Diese wurden nach genetischer Korrektur durch einen das LDL-Rezeptorgen eines Wildtyp-Kaninchens tragenden Retrovirus dem jeweiligen Tier ebenfalls transplantiert, was immerhin über einen Zeitraum von vier Monaten zu einer Serumcholesterinreduktion von 25-45% führte. Hinweise für eine serologisch fassbare Abstoßungsreaktion gegen das Genprodukt ergaben sich nicht [47, 51]. Zum Teil kontroverse Ergebnisse wurden 1991 durch Dichek et al. präsentiert. Hierbei wurden WHHL-Kaninchen Hautfibroblasten entnommen, in Kultur gebracht und anschließend mittels eines Retrovirus transduziert, der humane LDL-Rezeptor-cDNA enthielt. Die positiv selektionierten Zellen

wurden auf speziellen Gelatinepads gezüchtet, die den jeweiligen Tieren nachfolgend ins Retroperitoneum implantiert wurden. LDL-Rezeptor exprimierende Zellen konnten bis zu vier Wochen nach Implantation nachgewiesen werden, darüber hinaus konnte erstmals auch die Fähigkeit der genetisch korrigierten Zellen zur Supprimierung der HMG-CoA-Reduktase aufgezeigt werden. Zwar kam es nach Gentransfer zu einem signifikanten Abfall der Serumcholesterinkonzentration, jedoch konnte dieser auch bei den Kontrollgruppen aufgezeigt werden, die gar keine LDL-Rezeptor-cDNA erhalten hatten. Die Ursache hierfür ist letztlich unklar und möglicherweise in der unterschiedlichen Vektorenwahl für die Kontrollgruppen begründet. Zudem ließen sich in vielen der implantierten Pads inflammatorische Infiltrate nachweisen, die auf eine Abstoßungsreaktion hinweisen und damit eventuell für den nur transienten Nachweis rezeptor-positiver Zellen verantwortlich sein könnten [58].

Nach diesen ermutigenden Ergebnissen wurden die ersten *in vivo*-Gentherapieversuche Anfang der neunziger Jahre gestartet. So beschrieben Wilson et al. die erfolgreiche Durchführung eines leberspezifischen Gentransfers im WHHL-Kaninchen durch Verwendung eines DNA-Protein-Komplexes, der ein humanes LDL-Rezeptorgen enthielt und den Tieren über eine periphere Vene direkt injiziert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass sich das Konstrukt hepatotrop verhielt und dass es zur Bildung rekombinanter LDL-Rezeptor-RNA kam, deren Menge etwa 2-4% der Norm erreichte. Metabolisch äußerte sich dies in einer Senkung der Serumcholesterinkonzentration von 25-30%, welche bis sechs Tage nach dem Gentransfer anhielt [59, 119]. Bei anderen Ansätzen infundierten Wilson et al., Li et al. sowie Brown et al. WHHL-Kaninchen einen rekombinanten Adenovirus, welcher LDL-Rezeptor-cDNA enthielt. Auch hierbei konnte ein deutlicher Hepatotropismus aufgezeigt werden, das Ausmaß der hierdurch erreichten rekombinanten LDL-Rezeptorgenexpression war zudem wesentlich größer als in dem vorgenannten Versuch. Hinsichtlich des Lipidstoffwechsels konnte ein Absinken der Gesamt- und LDL-Cholesterinkonzentration beobachtet werden, das sein Maximum nach einer Woche erreichte und für etwa zwei Wochen anhielt. Begleitend konnten Li et al. und Brown et al. einen signifikanten Anstieg der HDL-Cholesterinkonzentration aufzeigen. Leider kam es bei der Arbeitsgruppe um Wilson et al. durch die Adenovirusgabe zur Bildung neutralisierender Antikörper, welche dem wiederholten Einsatz limitierend entgegenstanden [60-62].

2. AUFGABENSTELLUNG

Die Grundlage dieser Arbeit bildete die vorangegangene Entwicklung eines externen szintigraphischen Verfahrens, welches die Effizienz des durch Adenoviren vermittelten LDL-R-Gentransfers beim WHHL-Kaninchen *in vivo* darstellen kann. Umfangreiche Experimente hatten belegt, dass sich das Verfahren eignet, um LDL-Rezeptoren *in vivo* nachzuweisen und semiquantitative Aussagen über ihre Aktivität zu treffen, hierdurch kann ein Monitoring des LDL-Metabolismus bei Applikation radioaktiv markierter LDL gewährleistet werden [6].

Ziel dieser Arbeit war es nun, den Einfluß einer Virusdosisescalation auf Cholesterinsenkung und Langzeitexpression bei adenoviral vermittelten LDL-Rezeptorgentransferversuchen im Kaninchenmodell zu untersuchen. Begleitend sollten Aussagen über den Zeitpunkt des maximalen Therapieeffekts und seine Dauer sowie über den günstigsten Untersuchungszeitpunkt getroffen werden.

Zur Etablierung der Dosis-Wirkungs-Beziehung wurden LDL-Rezeptor defiziente Watanabe Heritable Hyperlipidemic (WHHL)-Kaninchen mit unterschiedlichen Dosierungen eines Adenovirus therapiert, der die Gensequenz für den humanen LDL-Rezeptor enthielt. In jeweils 2 Kaninchen wurden $0,23 \times 10^{12}$ pfu (plaque forming units) (1/10 Dosis), $1,175 \times 10^{12}$ pfu (1/2 Dosis), $2,35 \times 10^{12}$ pfu (1fache Dosis) und in ein Tier $4,7 \times 10^{12}$ pfu (2fache Dosis) injiziert. Vor und nach Gentransfer erfolgten über einen Zeitraum von sechs Wochen kontinuierlich Bestimmungen der Serumcholesterinkonzentrationen der Kaninchen sowie mehrfache LDL-Stoffwechselkinetiken. Hierfür wurden humane LDL aus Serum isoliert und nach Radioiodierung in die Kaninchen injiziert, um den LDL-Katabolismus aufzuzeichnen.

Zusätzlich wurde die Zeitabhängigkeit des Therapieeffekts untersucht und der günstigste Untersuchungszeitpunkt determiniert. Dazu wurde der Therapieerfolg über einen Zeitraum von bis zu 120 Tagen durch ^{111}In -Scanaufnahmen 20 Tage vor sowie 4, 30, 58 und 113 Tage nach Gentransfer dokumentiert. Hierbei wurden maximaler Therapieeffekt und Dauer der Wirkung begutachtet. Dazu wurden 0, 4 und 24 Stunden nach der Injektion von ^{111}In -markierten LDL Scanaufnahmen angefertigt und zur quantitativen Ermittlung der Gentransfereffizienz der Leber/Herz-Quotient ermittelt, welcher als Maß der spezifischen Traceranreicherung diene.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Gentherapeutische Methoden

3.1.1 Vektor

Als Vektor diente ein Konstrukt aus einem Adenovirus des Serotyps 5, in welchen die cDNA des humanen LDL-Rezeptors sowie ein vorgeschalteter CMV-Promotor einkloniert wurden. Abbildung 9 illustriert hierbei den schematischen Aufbau des verwendeten Adenoviruskonstrukts [63, 64, 120], welches freundlicherweise von der Arbeitsgruppe M. Strauß und G. Cichon (Max-Delbrück-Zentrum, Berlin) zur Verfügung gestellt wurde.

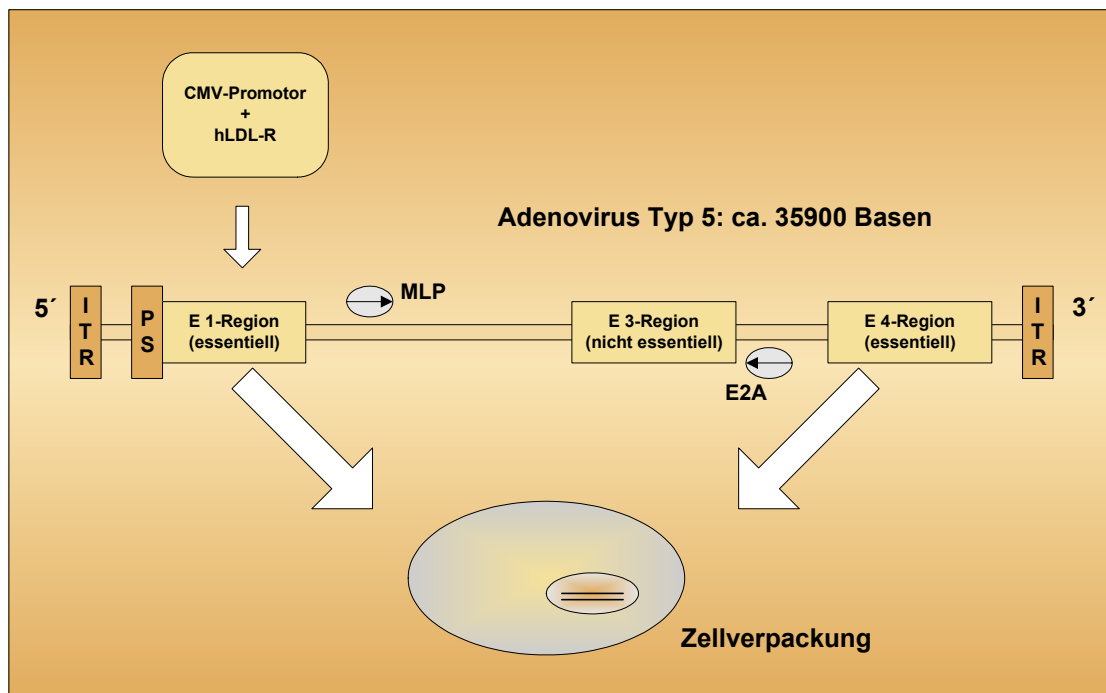


Abbildung 9: Adenoviruskonstrukt mit einkloniertem LDL-Rezeptoren und CMV-Promotor.

3.1.2 Präparation des Virus

Große Mengen rekombinanter Adenoviren wurden in 293-Zellen produziert, welche in DMEM, 10% FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Gibco BRL Life Technologies, Berlin, Deutschland) bei 37°C in einer 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert wurden. Bei 70-80% Konfluenz wurden die Zellen mit Viren einer Dichte von MOI = 5 infiziert und für 48 Stunden inkubiert, danach erfolgte die Sammlung der Zellen sowie Lyse mittels Ultraschall. Der Virus-enhaltende Extrakt wurde für 10 Minuten bei 12.000xg zentrifugiert,

anschließend wurden die Viruspartikel durch Zugabe von 0,5 Volumen Polyethylenglycol (PEG) 20%, 2,5 M NaCl und 1 Stunde Inkubation auf Eis gefällt. Das Virus wurde bei 12.000xg für 10 Minuten abzentrifugiert und in 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM Tris/HCl, pH 7,4 resuspendiert. Über Nacht wurde gegen denselben Puffer dialysiert. Vor weiteren Verwendungen erfolgte die Sterilfiltration der Viruslösung durch einen 0,22 µm Filter.

3.1.3 Gentherapie und Scantechnik

Vor der Gentherapie wurde zunächst eine ¹²⁵I-LDL-Kinetik über 72 Stunden durchgeführt. Nach Abklingen der Radioaktivität wurde den WHHL-Kaninchen dann mit ¹¹¹In markiertes humanes LDL (pro Tier ~3,5-5,0 MBq ¹¹¹In-LDL) injiziert und seine Distribution mittels In-Szintigraphie unmittelbar post injectionem sowie nach 1, 4 und 24 Stunden dokumentiert, hierfür wurde eine „large field gamma“ Kamera (Siemens Diacam, 172/247 keV, ME-Kollimator) verwendet. Die mit Ketanest sedierten Tiere wurden dazu jeweils zu zweit auf dem Kamerakopf gelagert. Nach neuerlichem Abklingen der Aktivität wurde den Tieren der frisch präparierte Vektor in unterschiedlichen Dosierungen über eine periphere Ohrvene injiziert. Vier Tage nach Durchführung des Gentransfers wurde den Kaninchen erneut ¹¹¹In-LDL verabreicht und unmittelbar post injectionem sowie nach 1 und 24 Stunden eine In-Szintigraphie durchgeführt. Weitere In-Szintigraphien schlossen sich nach 30, 58 und 113 Tagen an. Das Impulsdichte-Verhältnis wurde aus den ROI's (region of interest) der Leber und des Herzens ermittelt. Das Leber/Herz-Verhältnis wurde als quantitativer Index für die spezifische Tracer-Akkumulation in der Leber verwendet. Begleitend wurde 6 Tage nach dem Gentransfer eine ¹²⁵I-LDL-Kinetik über 48 bis 72 Stunden gestartet, zusätzliche Kinetiken erfolgten darüber hinaus nach 24 bzw. 120 Tagen.

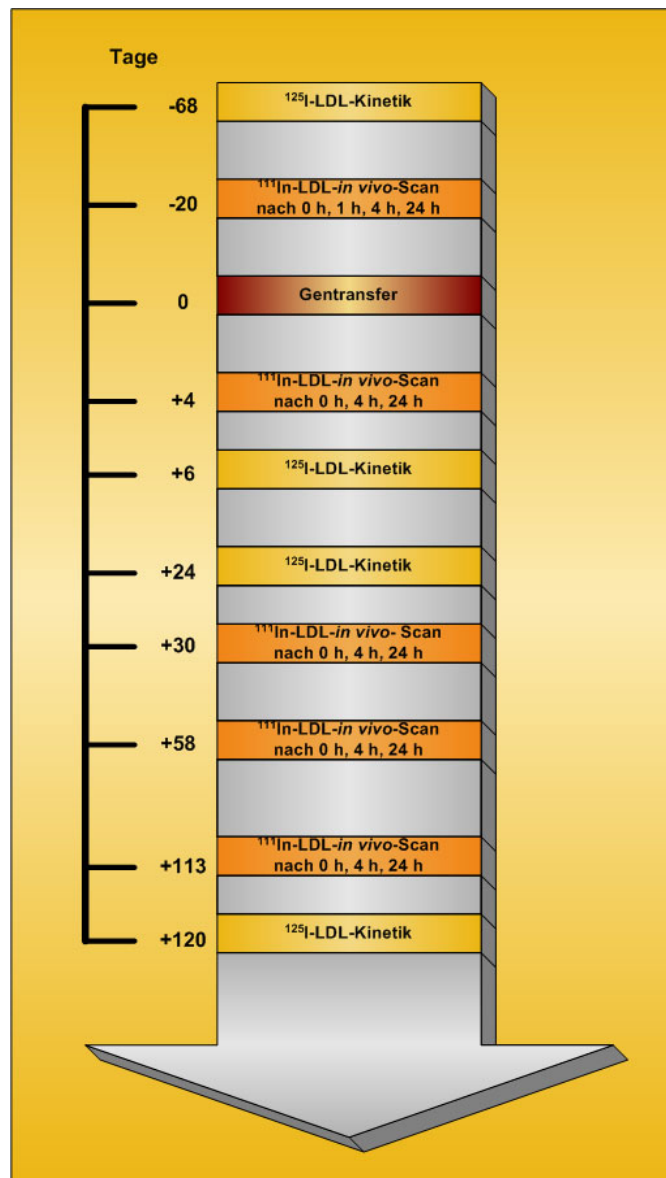


Abbildung 10: Zeitlicher Ablauf des Gentherapieversuchs

3.2 Lipoproteingewinnung und -aufbereitung

3.2.1 Isolation humaner Lipoproteine aus Serum

Die fraktionierte Ultrazentrifugation ist ein Standardverfahren zur Isolation der Lipoproteine aus Serum. Hierbei werden durch Einstellen des entsprechenden Dichtebereiches mit NaBr bzw. KBr die jeweiligen Lipoproteine in der Ultrazentrifuge zum Flotieren gebracht, d. h. sie schwimmen oben auf der Lösung auf, während sich die schwereren Bestandteile im unteren Teil des Zentrifugationsröhrchens sammeln. Die Trennung der Fraktionen wird durch ein Schneiden der Röhrchen erreicht, anschließend erfolgt durch ein erneutes Einstellen der Dichte eine weitere Auftrennung der Lipoproteine [65].

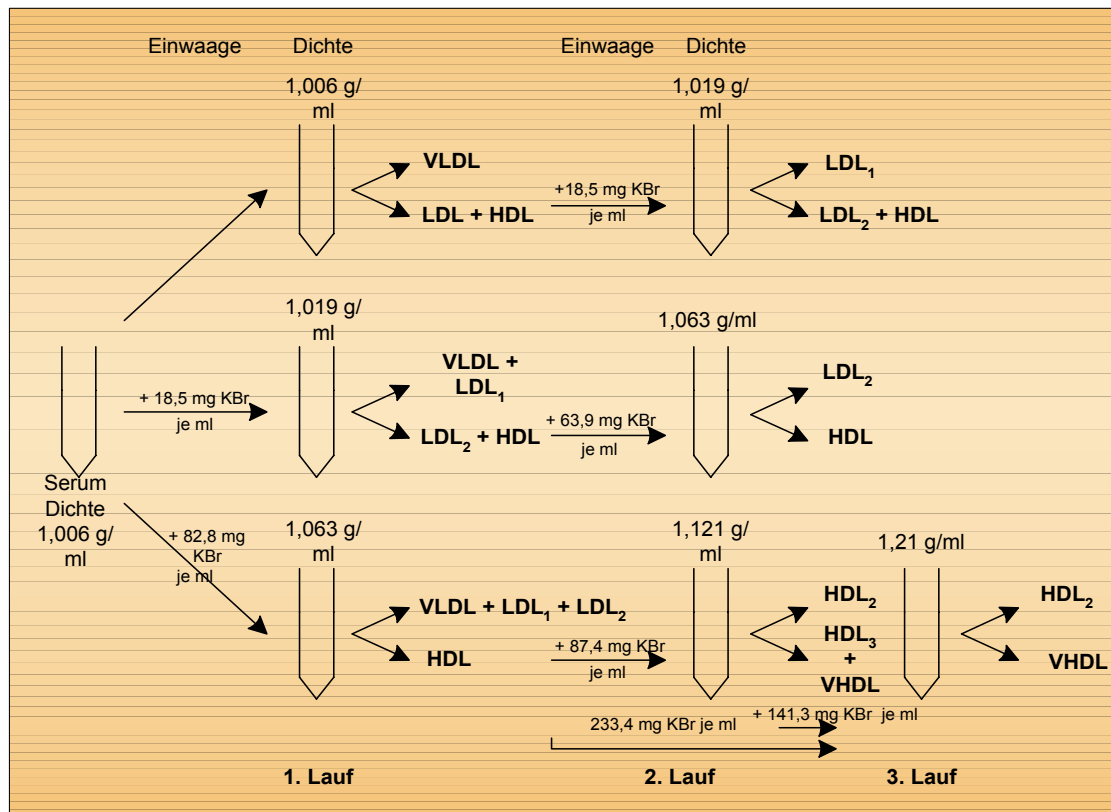


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Lipoproteinisolierung mittels fraktionierter Ultrazentrifugation.

Zur Isolation des humanen LDL wurde normolipämischen Probanden mit einer Monovette (Braun, Melsungen) Blut entnommen und nach Gerinnung bei 3.000 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert (Digifuge GL, Heraeus). Danach wurden je 1 ml Serum pro Röhrchen (Polycarbonate centrifugal tube, Beckmann) bei einer angenommenen Dichte $d = 1,006 \text{ g/ml}$ in der Minifuge (TL-100 Ultrazentrifuge, Beckmann) bei 100.000 rpm für 2,5 Stunden zentrifugiert. Nachfolgend wurden die Röhrchen oberhalb der LDL-Bande geschnitten (ca. Hälfte des Röhrchens), der Überstand wurde verworfen.

Je 0,0828 g KBr wurden in neue Röhrchen eingewogen und jeweils 1 ml der LDL-Fraktion hinzugefügt (angenommene Dichte $d = 1,063 \text{ g/ml}$), anschließend erfolgte erneut eine Zentrifugation über 2,5 Stunden bei 100.000 rpm. Danach wurden die Röhrchen unterhalb der LDL-Bande geschnitten (ca. Hälfte des Röhrchens), diesmal wurde der Unterstand verworfen. Abschließend erfolgte die Umpufferung der LDL-Fraktion gegen Phosphatpuffer. Hierfür wurden je 1 ml der LDL-Fraktion in ein Ultrafree 15 Zentrifugations-Filtrations-Röhrchen (Millipore) gegeben und 7 ml Phosphatpuffer zugefügt, anschließend erfolgte eine Zentrifugation für ca. 10 Minuten bei 2.000 g (Restvolumen 1 ml). Mit je 5-8 ml Puffer wurde dieser Filtrationsschritt noch 4-5 Mal wiederholt.

Phosphatpuffer (für Indium-Markierungen):

50mM Na-Phosphat pH 7,4

100 mM NaCl

in entionisiertem Wasser !!

4,879 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Mw 177,99 g/mol)

+ 3,12 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Mw 137,99 g/mol) für 1000 ml

+ 5,844 g NaCl (Mw 58,44 g/mol)

Glycinpuffer (für Iod-Markierungen):

1 M Glycin pH 10

7,507 g Glycin (Mw 75,07 g/mol) für 100 ml

pH mit NaOH einstellen 10 M bzw. 10 mM

3.2.2 Radiomarkierung von LDL

3.2.2.1 Iod-Monochlorid-Methode

Zur Radioiodmarkierung wurde das Isotop ^{125}I ($t_{1/2}$: 60,14 Tage, γ -Strahler) eingesetzt. Nach Sterilfiltration der isolierten LDL (0,2 μm Millipore Filter, Gelman, Acrodisc, Ann Arbor, Michigan, USA) wurden diese nach der modifizierten Iod-Monochlorid-Methode radiomarkiert [66-68].

Folgender Reaktionsmechanismus wird für die Markierung angenommen:

Im ersten Schritt erfolgt ein schneller Isotopenaustausch zwischen Na^{125}I und ICl . Im zweiten Schritt greift das positiv polarisierte Iod aus dem ICl den Benzolring der Aminosäure Tyrosin des Proteins nach dem Mechanismus einer elektrophilen aromatischen Substitution an. Letztere erfolgt dabei in O-Stellung zur Hydroxylgruppe des Tyrosins [69].

Zur Iodierung des LDL wurde Na^{125}I mit einer Aktivität von 2,7 mCi (100 MBq) eingesetzt.

1 mg frisch isolierter LDL (in 1M Glycin-Puffer, pH 10) wurden mit der entsprechenden Menge Na^{125}I versetzt. Anschließend wurde zu dieser Mischung Iodmonochlorid gegeben, wobei das molare Verhältnis von Protein:ICl dabei 1:10 betragen sollte. Nach gründlicher Durchmischung wurde der Ansatz dann 10-15 Minuten inkubiert.

Nachfolgend wurde das Reaktionsgemisch zur Trennung von radiomarkiertem LDL und verbliebenem freien Iod über eine Sephadex G-25 Gelfiltrations-Säule (1x15 cm) chromatographiert. Hierbei wurde die Säule zuvor mit Kaninchenserum equilibriert, um die unspezifische Bindung von LDL an das Sephadexmaterial zu minimieren. Als Elutionspuffer diente PBS, die Energie der einzelnen Säulenfraktionen wurde durch einen Monitor erfaßt. Die Effizienz der Markierung wurde dünnschichtchromatographisch überprüft (Gelman ITLC SG, PBS-Puffer, 1 µl Probe, 7,5 cm Laufstrecke).

3.2.2.2 Radiomarkierung mit $^{111}\text{InCl}_3$

Die Radiomarkierung von Proteinen mit Indium (^{111}In $t_{1/2}$: 2,83 Tage, γ -Strahler) erfolgt mit Hilfe des Komplexbildners DTPA (*Diethylene triamine pentaacetic acid*) [70-72]. Hierbei wird zunächst DTPA (als Dianhydrid) an das Protein bzw. die Proteinkomponente gebunden. Danach erfolgt die Komplexbildung des Indiums mit dem Protein-gekoppelten DTPA [73-77].

In 10 ml getrocknetem Chloroform (Molekularsieb 4Å) wurden 2 mg DTPA-Dianhydrid für die Kopplungsreaktion suspendiert und für 10 Minuten gerührt. Danach wurde das CHCl_3 im N_2 -Strom verdampft und das LDL (1 mg in 1000 µl PBS) hinzugegeben, anschließend wurde die Mischung abermals 30 Minuten gerührt.

Mit Hilfe von Amicon-Filtern (grün, co: 3,500 kDa) wurde das Kopplungsprodukt in der Eppendorffzentrifuge gegen 0,2 M Citratpuffer ultrafiltriert. Schließlich wurde das Kopplungsprodukt mit Citratpuffer auf ein Volumen von 1 ml gebracht und mit InCl_3 (in HCl, Aktivität ca. 160 MBq) versetzt. Der Ansatz wurde geschüttelt und 30 Minuten inkubiert.

Über eine Sephadex G-25 Gelfiltrations-Säule (1x15 cm) wurde das Reaktionsgemisch zur Trennung von radiomarkiertem Protein und verbliebenem freien Indium chromatographiert. Zuvor wurde die Säule mit Kaninchenserum equilibriert, um die unspezifische Bindung von LDL an das Sephadexmaterial zu minimieren. Als Elutionspuffer diente isotonische Kochsalzlösung (0,9% NaCl), ein Monitor erfaßte die Energie der einzelnen Säulenfraktionen. Die Effizienz der einzelnen Säulen wurde dünnschichtchromatographisch überprüft (Gelman

ITLC SG, 0,1 M Citratpuffer pH 5, 1-2 µl Probe, 7,5 cm Laufstrecke).

3.3 Stoffwechselkinetische Untersuchungen

3.3.1 Kaninchen

Sechs Monate alte weibliche Watanabe Kaninchen (WHHL) wurden von Herrn Prof. Dimigen (Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg) bezogen. Sie zeichnen sich durch einen kongenitalen LDL-Rezeptordefekt aus, der zu einer starken Elevation der Serumcholesterinkonzentration und damit zu Xanthomen sowie einer prämaternen Atherosklerose und koronaren Herzerkrankung führt. Da die klinischen Symptome mit denen eines FH-Patienten gut korrelieren, stellen die WHHL-Kaninchen ein hervorragendes Tiermodell zur Untersuchung der Familiären Hypercholesterinämie dar.

3.3.2 Kaninchenhaltung

Während der Untersuchungen wurden die Kaninchen in einem 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus in der Nuklearmedizin der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) in einem S2-Tier-C-Labor in speziellen Stoffwechselkäfigen gehalten, welche die gesonderte Sammlung von Urin und Kot ermöglichten. Die Nahrungszufuhr erfolgte über automatische Futter- und Wasserspender (Kaninchenstandardfutter, Wasser ad libitum).

Außerhalb der Untersuchungen wurden die Tiere im zentralen Tierlabor der MHH gehalten und von den dortigen Tierpflegern versorgt.

3.3.3 Kinetik

Die Proteine wurden mit ^{125}I radiomarkiert und unmittelbar danach den Kaninchen über die Ohrvene injiziert, hierbei wurde jeweils eine Aktivität von 1,1 MBq verwendet. Zu den Zeitpunkten 5 Min., 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48 sowie 72 Stunden post injectionem wurde den Tieren über die Ohrarterie ca. 2 ml Blut entnommen, zentrifugiert und das Serum aufbewahrt. Anschließend wurden 500 µl Aliquots dieser Seren im Gamma-Counter (Compu-Gamma, Pharmacia) auf ihre Aktivität hin untersucht. Zusätzlich wurde während der Kinetik der Urin der Kaninchen gesammelt, aliquotiert und die Aktivität bestimmt. Die während der Kinetik gewonnenen Seren wurden darüber hinaus mittels FPLC-Analyse bezüglich ihrer Aktivitätsdistribution untersucht.

3.3.4 Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC)-Analyse

Die Analyse der Serumproben erfolgte über eine Superose-6-Gelfiltrationssäule (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Diese zeichnet sich durch stark quervernetzte Agarose-Beads aus, die einen Durchmesser von $10-13 \pm 2 \mu\text{m}$ aufweisen. Der Trennbereich der Säule liegt für globuläre Proteine zwischen 5.000 und 5.000.000 kDa. Das Material ist in einem pH-Bereich von 1-14 stabil und wird auch durch chaotrope Reagenzien wie SDS, Harnstoff und Guanidinhydrochlorid nicht beeinflusst.

Zur Fraktionierung von Serumproben wurde die Superose-6-Säule in 1 x PBS, 1 mM EDTA, 0,001% (w/v) NaN_3 equilibriert. 0,2 ml Kaninchenserum wurden auf die Säule aufgebracht und mit einer Flußrate von 0,3 ml/Min. eluiert. Nach 10 ml Vorlauf wurden 0,5 ml Fraktionen gesammelt und ihre Radioaktivität am Gamma Counter gemessen.

3.4 Quantitative Methoden

3.4.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Gesamtproteinmenge wurde mit einer modifizierten Methode nach Lowry, mit BSA als Standard, bestimmt [78].

Lösung 1:

2 % Na_2CO_3 in 0,1 M NaOH
(500 ml 0,1 M NaOH + 10 g Na_2CO_3)

Lösung 2:

0,5 % CuSO_4 in 0,1% Na-tatrat
(Lösung muß vor Gebrauch frisch hergestellt werden,
dazu 1% CuSO_4 und 0,2% Na-tatrat 1:1 mischen.)

Lösung 3:

Lösung 1 + 2 50/1 mischen.

Lösung 4:

Folin–Ciocalteu–Reagenz (gebrauchsfertig)

Reagenz 0,1% NaOH dH₂O

50 : 50 : 6

Lösung 5:

BSA-Standard-Lösung 1 mg/ml

	Std.1 0 µg	Std. 2 50 µg	Std. 3 100 µg	Std. 4 200 µg	Std. 5 300 µg	Std. 6 400 µg	Proben
BSA	0 µl	50 µl	100 µl	200 µl	300 µl	400 µl	50-200 µl
Triton 1 %	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
SDS 10 %	800 µl	750 µl	700 µl	600 µl	500 µl	400 µl	600-750 µl
Lösung 3	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
gut mischen, 10 min inkubieren							
Folin-Reagenz	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl
gut mischen, 30 min inkubieren							

Die Messung der Proben erfolgte bei 545 nm am Photometer (U-2000 Spectrophotometer, Hitachi, Düsseldorf, Deutschland). Von allen Proben und Standards wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford

(Protein-Assay der Firma BioRad, München, Deutschland)

Standard Assay (20-140 µg Protein; 200-1400 µg/ml)

Standardkurve:

Verdünnungsreihe von 0,2 – 1,4 mg/ml Protein

BSA-Stammlösung: 4 mg/ml

Verdünnung	BSA-Konzentration in mg/ml	Ansatz
1:20	0,2	50 µl + 950 µl
1:10	0,4	100 µl + 900 µl
1:6,6	0,6	150 µl + 850 µl
1:5	0,8	200 µl + 800 µl
1:4	1	250 µl + 750 µl
1:3,3	1,2	300 µl + 700 µl

Ansatz:

1. 0,1 ml Standard bzw. Probe
oder 0,1 ml Puffer als Blindwert
2. 5 ml Reagenz (1:5 Verd.)
3. Mischen (vortexen), 5 Min. warten
4. Messung der Extinktion bei 595 nm

Microassay (1-20 µg Protein, < 25 µg/ml)

Standardkurve:

Verdünnungsreihe von 1-25 µg/ml Protein

BSA-Stammlösung: 0,1 mg/ml

Verdünnung	BSA-Konzentration in µg/ml	Ansatz
1:100	1	10 µl + 990 µl
1:20	5	50 µl + 950 µl
1:10	10	100 µl + 900 µl
1:6,6	15	150 µl + 850 µl
1:5	20	200 µl + 800 µl
1:4	25	250 µl + 750 µl

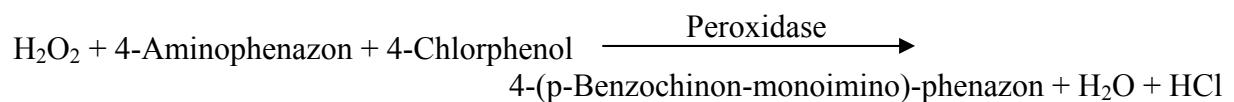
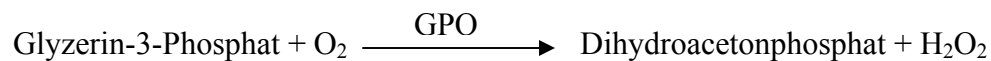
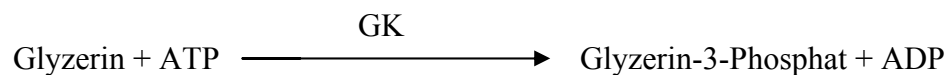
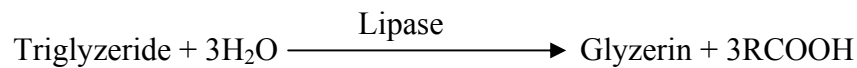
Ansatz:

1. 0,8 ml Standard bzw. Probe
oder 0,8 ml Puffer als Blindwert
2. 0,2 ml Reagenz unverdünnt
3. Mischen (vortexen), 5 Min. bis 1 Std. warten
4. Messung der Extinktion bei 595 nm

3.4.3 Quantitative Triglyzeridbestimmung

Peridochrom® Triglyzeride GPO-PAP Testkit (Immuno, Heidelberg, Deutschland)

Prinzip:



Reagenzlösung:

- 0,5 mM ATP
- 0,35 mM 4-Aminophenazon
- 3 U/ml Lipase
- 2,5 U/ml Glyzerinphosphatoxidase
- 0,2 U/ml Glyzerokinase
- 0,15 U/ml Peroxidase
- 3,5 mM 4-Chlorphenol

200 µl Probe werden mit 2 ml Reagenzlösung gemischt und 10 Minuten inkubiert. Die Extinktion der Probe wird bei 470-560 nm am Spektralphotometer (Hitachi U-2000) gegen einen Reagenzleerwert gemessen.

Die Konzentration der Triglyzeride wird nach folgender Formel berechnet:

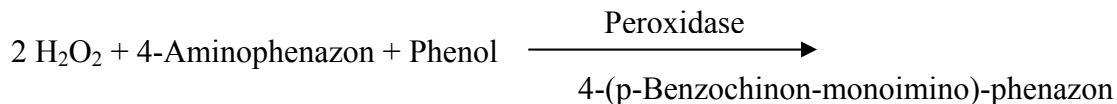
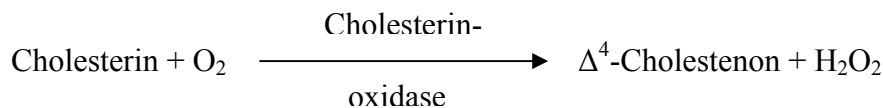
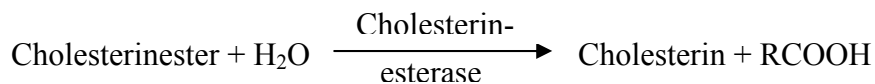
$$c \text{ (mg/dl)} = 1040 \times E_{\text{probe}} \text{ (Hg 546 nm) bzw.}$$

$$c \text{ (mmol/l)} = 11,9 \times E_{\text{probe}} \text{ (Hg 546 nm)}$$

3.4.4 Quantitative Cholesterinbestimmung

(CHOD-PAP-Methode Testkit (Immuno, Heidelberg, Deutschland))

Prinzip:



Reagenzlösung:

100 mM Tris pH 7,7

50 mM Mg 2+

1 mM 4-Aminophenazon

10 mM Na-Cholat

6 mM Phenol

4 mM 3,4-Dichlorphenol

0,3% Fettalkoholpolyglykolether

0,4 U/ml Cholesterinesterase

0,25 U/ml Cholesterinoxidase

0,2 U/ml Peroxidase

200 µl Probe werden mit 2 ml Färbereagenzlösung gemischt und 10 Minuten inkubiert. Die Extinktion der Probe wird bei 470-560 nm am Spektralphotometer (Hitachi U-2000) gegen einen Blindwert gemessen.

Die Konzentration des Cholesterins wird nach folgender Formel berechnet:

$$c \text{ (mg/dl)} = 853 \times E_{\text{probe}} \text{ (Hg 546 nm)} \text{ bzw.}$$

$$c \text{ (mmol/l)} = 22,1 \times E_{\text{probe}} \text{ (Hg 546 nm)}$$

3.4.5 Qualitative und quantitative Plasmalipoproteinbestimmung mit der Lipidelektrophorese

In einem albuminhaltigen Agarmedium werden die Lipoproteine elektrophoretisch getrennt und anschließend durch chemische Präzipitation mit Polyanionen dargestellt. Die Auswertung erfolgt densitometrisch.

Reagenzien (Immuno, Heidelberg, Deutschland):

Agarmediumträger, albuminhaltig

Kammerpuffer:

62,1% Diethylbarbitursäure Na-Salz

29,2% Na-Acetat

8,7% Zitronensäure

Entwickler 1:

6,3 mM Phosphorwolframsäure

182 mM MgCl₂

70 mM NaCl

12 mM NaN₃

Entwickler 2:

6,3 mM Phosphorwolframsäure

182 mM MgCl₂

1,12 mM NaCl

12 mM NaN₃

Das zu untersuchende Serum wird 1:1 mit Agarversiegelungsmedium gemischt und auf die

Elektrophoreseplatten aufgetragen. Die Elektrophorese wird in der Radiophor M3 Elektrophorese-Kammer (Immuno, Heidelberg, Deutschland) für 80 Minuten bei konst. 15 mA/Gelplatte durchgeführt, anschließend werden die Platten jeweils für 30 Minuten in den Entwicklungslösungen 1 und 2 inkubiert. Die quantitative Bestimmung erfolgt densitometrisch (ATH Hirschman Liposkript Al Densitometer). Die Lipoproteine werden dabei nach ihrer Wanderung im elektrischen Feld in die α -Fraktion (HDL), prä- β -Fraktion (VLDL) und die β -Fraktion (LDL) unterschieden.

4. ERGEBNISSE

4.1 Selektion eines geeigneten Tiermodells

Zur Etablierung gentherapeutischer *in vivo*-Strategien für die FH sind in den vergangenen Jahrzehnten verschiedene Tiermodelle benutzt worden.

Ein Beispiel stellen LDL-R knockout Mäuse dar, die durch LDL-Rezeptor-Gen-Disruption generiert werden. Durch Fütterung einer cholesterinreichen Diät können diese Tiere ein klinisches Erscheinungsbild entwickeln, das dem der FH ähnelt. Da jedoch insgesamt deutliche Unterschiede gegenüber dem menschlichen Fettstoffwechsel bestehen, scheinen die WHHL-Kaninchen als Tiermodell besser geeignet [63, 79-81].

Watanabe Heritable Hyperlipidemic (WHHL)-Kaninchen stellen derzeit das geeignetste Tiermodell der FH dar, da der Lipoproteinmetabolismus des Kaninchens trotz der imponierenden HDL-Fraktion dem des Menschen relativ ähnlich ist. So leiden auch diese Tiere unter einem LDL-Rezeptordefekt, der mit einer deutlichen Elevation der Plasma-LDL-Konzentration vergesellschaftet ist und so eine prämatüre Atherosklerose hervorruft [33, 34, 47, 53-57]. Die Ursache des Defekts ist eine 12 Nukleotide lange in-frame-Deletion des LDL-Rezeptorgens, welche zu einem Verlust von vier Aminosäuren in der Ligandenbindungsdomäne und damit zu einem funktionsunfähigen Genprodukt führt [50, 54]. Das wiederum bewirkt geno- und phänotypisch deutliche Parallelen zum Verlauf der FH beim Menschen und führt in der Regel innerhalb der ersten drei Lebensjahre des Tieres zum Tod.

Die FH zeichnet sich typischerweise durch eine ausgeprägte Elevation der LDL-Cholesterinserumkonzentration im Serum aus. Eine Analyse der Lipoproteindistribution und somit auch der Cholesterinverteilung im Serum wird durch die Lipidelektrophorese gewährleistet, welche die Lipoproteine nach ihrer Migrationsfähigkeit im Agarosegel in die Fraktionen α -Cholesterin (HDL), prä- β -Cholesterin (VLDL) und β -Cholesterin (LDL) unterteilt (siehe auch Tabelle 4).

Nach densitometrischer Auswertung der Lipidelektrophorese wird die quantitative Verteilung der Lipoproteine ermittelt. Beim WHHL-Kaninchen kann hierbei eine Gesamtcholesterinfraktion im Plasma von 600-800 mg/dl aufgezeigt werden, wobei der Hauptanteil durch die LDL-Fraktion ausgemacht wird, andere Lipoproteinfraktionen sind kaum nachweisbar.

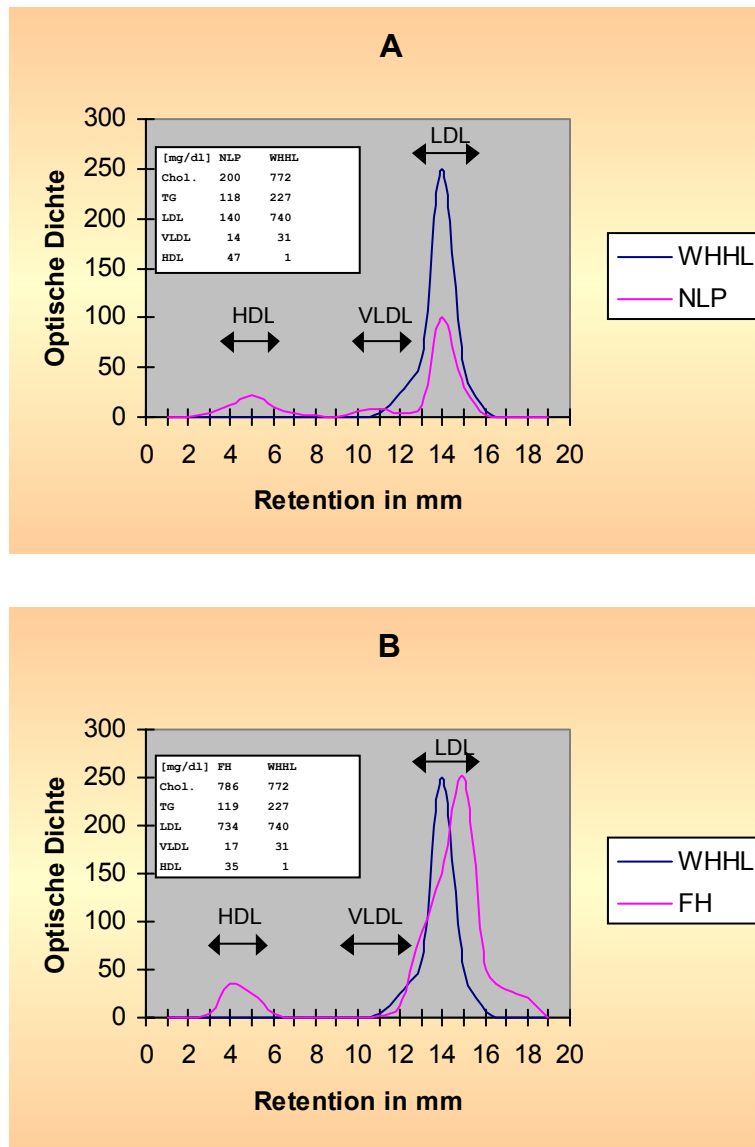


Abbildung 12:

A: Densitometrische Auswertung einer Lipidelektrophorese eines normolipämischen Patienten (NLP) im Vergleich zu einem WHHL-Kaninchen.

B: Densitometrische Auswertung einer Lipidelektrophorese eines FH-Patienten im Vergleich zu einem WHHL-Kaninchen.

Abbildung 12A illustriert die Lipidelektrophorese eines normolipämischen Patienten im Vergleich zum WHHL-Kaninchen. Hierbei ist die gute Übereinstimmung der humanen mit der Kaninchen-LDL-Fraktion deutlich zu erkennen. Abbildung 12B stellt vergleichend Lipidelektrophoresen eines WHHL-Kaninchens und eines Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie gegenüber, wobei jeweils die prominente LDL-Fraktion augenscheinlich ist. Da die WHHL-Kaninchen hinsichtlich ihres Lipidmetabolismus also große Parallelen zu FH-

Patienten aufweisen, sind sie ein geeignetes und natürlich vorkommendes Tiermodell zur Etablierung des LDL-R-Gentransfers im Tierversuch.

4.2 Gentransfer

Der Gentransfer wurde mittels des replikationsdefizienten Virus Ad-CMV-hLDL-R (Adenovirus Typ 5 mit dem humanen LDL-Rezeptor-Gen und einkloniertem CMV-Promotor) durchgeführt. Da die Effizienz des Verfahrens im Vorfeld im Vergleich zu einer mit Ad-CMV- β -Gal (Adenovirus mit β -Gal-Gen und einkloniertem CMV-Promotor) therapierten Kontrollgruppe bereits ausgiebig belegt worden war [6], wurde zur Beurteilung des Dosisescalationseffekts auf eine Kontrollgruppe verzichtet.

Die sterile virushaltige Suspension wurde auf Körpertemperatur erwärmt und den Kaninchen via Ohrvene in unterschiedlichen Dosierungen injiziert. Dabei erhielten je zwei Tiere $0,23 \times 10^{12}$ pfu (1/10 Dosis), $1,175 \times 10^{12}$ pfu (1/2 Dosis), $2,35 \times 10^{12}$ pfu (1fache Dosis) sowie ein Tier $4,7 \times 10^{12}$ pfu (2fache Dosis). Komplikationen wie Anzeichen einer Lungenembolie oder eine erhöhte Körpertemperatur konnten bei diesen Dosierungen nicht beobachtet werden, jedoch trat bei einem Kaninchen, das mit der $\frac{1}{2}$ Virusdosis behandelt worden war, zwei Tage nach Gentherapie eine passagere Makrohämaturie auf. Insgesamt war in den ersten Tagen nach Gentransfer eine allgemeine Schwäche und Appetitlosigkeit zu beobachten, welche mit der verwendeten Virusmenge positiv korrelierte.

4.3 Cholesterinverläufe nach Gentransfer mit Ad-CMV-hLDL-R

Um die Entwicklung der Cholesterinwerte im Verlauf der hLDL-R-Expression beurteilen zu können, wurde den Tieren vor und nach Gentransfer zur Cholesterinbestimmung regelmäßig Nüchternblut entnommen. Während dieses sechswöchigen Zeitraumes erhielten die Tiere weiterhin ein Kaninchenstandardfutter, welches 12 Stunden vor der jeweiligen Blutentnahme aus dem Käfig entfernt und erst nach Probengewinnung wieder verabreicht wurde. Die Wasseraufnahme war während des gesamten Experiments hingegen ad libitum gewährleistet.

Abbildung 13 stellt den Serumcholesterinverlauf der Kaninchen ab dem ersten Tag nach Gentransfer mit Ad-CMV-hLDL-R in den genannten Dosierungen dar. Hierbei ist der Einfluß der Virusdosis auf die Cholesterinhöhe eindeutig zu erkennen. Während es durch Applikation von 1/10 der Dosis lediglich zu einer geringen Senkung der Cholesterinwerte um 13 bzw. 19% kommt, ist nach Verabreichung der einfachen Dosis eine Reduktion um 74% und nach Gabe der

doppelten Dosis sogar ein Absinken um 90% zu beobachten. Der dabei beobachtete maximale Rückgang war jeweils am 5.-7. Tag nach Gentransfer zu verzeichnen, innerhalb von 12-18 Tagen nach Vektorgabe trat bei allen Kaninchen unabhängig von der verabreichten Virusdosis eine Nivellierung des Effekts mit Wiedererreichen der Ausgangswerte ein.

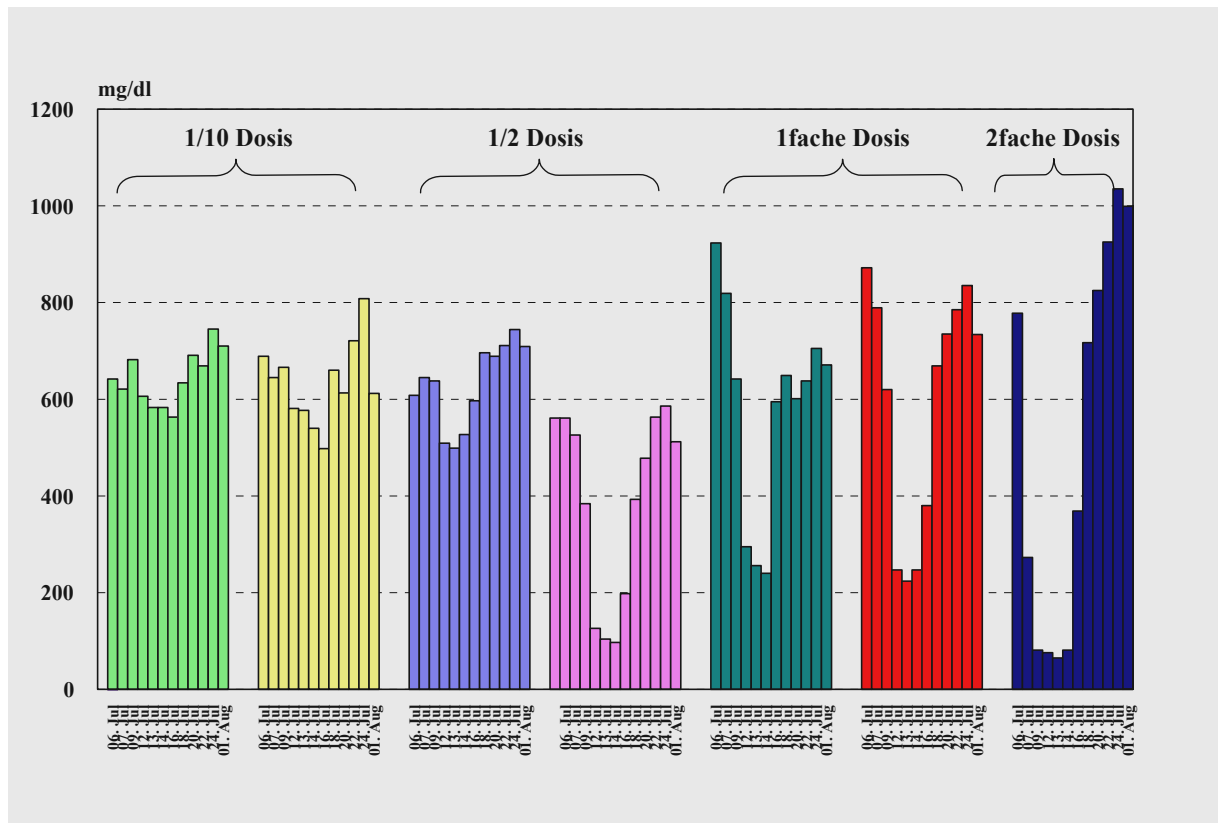


Abbildung 13: Cholesterinverläufe gentherapierter Kaninchen bei Applikation unterschiedlicher Virusdosen (1/10 Dosis, ½ Dosis, 1fache Dosis, 2fache Dosis).

4.4 Selektion eines geeigneten Tracers zur LDL-Radiomarkierung

Prämisse für die Durchführung der *in vivo*-Scanuntersuchungen war die Verwendung eines Radiotracers, mit dem sich LDL-Partikel markieren lassen und der einer szintigraphischen Detektion zugänglich ist. Da der LDL-Katabolismus bei Patienten mit FH deutlich verlangsamt ist und somit auch Tage nach Injektion der radiomarkierten LDL noch Untersuchungen zur Analyse der hepatischen LDL-Aufnahme sinnvoll sind, mußte zudem ein Radiotracer verwendet werden, der auch noch nach einigen Tagen nachweisbar ist. Hierbei standen die Radionuklide ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ sowie ^{111}In zur Auswahl, welche unter Einbeziehung ihrer Halbwertszeit und ihres Emissionsmaximums zusammenfassend in Tabelle 7 dargestellt sind [71, 72, 82-92].

Tracer	Halbwertszeit	Emissionsmaximum (MeV)	
		E_{β}	E_{γ}
^{125}I	60 Tage	-	0,035
^{131}I	8,04 Tage	0,61	0,364
^{123}I	13 Stunden	-	0,159
^{111}In	2,83 Tage	-	0,173
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6 Stunden	-	0,14

Tabelle 7: Mögliche Radiotracer zur Markierung von LDL [93].

^{125}I erwies sich für die *in vivo*-Scans als weniger geeignet, da die Halbwertszeit des Nuklides (60 Tage) für eine Anwendung im Menschen zu lange ist. Zudem besitzen die abgestrahlten Photonen energetisch ein zu niedriges Niveau und sind damit szintigraphisch nicht ausreichend darstellbar [71, 84]. ^{123}I und $^{99\text{m}}\text{Tc}$ wiederum erschienen infolge ihrer zu geringen Halbwertszeit nicht geeignet, da sie bereits nach kurzer Zeit nicht mehr nachweisbar sind [71, 84, 88]. Die besten Voraussetzungen schien damit der Gammastrahler ^{111}In mit einer Halbwertszeit von 2,83 Tagen und einem Emissionsmaximum bei 0,173 MeV zu liefern, dessen Halbwertszeit zudem mit der Halbwertszeit der LDL in gesunden Probanden vergleichbar ist. Dass sich dieses Radionuklid gut zur LDL-Markierung mit nachfolgender szintigraphischer Detektion und Monitoring des LDL-Metabolismus eignet, war darüber hinaus im Rahmen der Entwicklung des *in vivo*-Scanverfahrens hinreichend belegt worden [6].

Für die stoffwechselkinetischen Untersuchungen zum LDL-Metabolismus wurde der Radiotracer ^{125}I verwendet, dessen diesbezügliche Anwendung bereits ausreichend etabliert ist [87, 88, 90, 94].

4.5 Stoffwechselkinetische Untersuchungen

Es wurden *in vivo*-Stoffwechseluntersuchungen durchgeführt, um die durch den LDL-R-Gentransfer vermittelte gesteigerte hepatische Aufnahme Indium-markierter LDL und die Cholesterinsenkung durch gesteigerten Katabolismus als Folge einer erhöhten LDL-R-Aktivität zu bestätigen. Dafür wurden humane LDL isoliert und mit dem Iodisotop 125 markiert, nachfolgend erfolgte die Injektion in die WHHL-Kaninchen. Aus den sich anschließenden Blutentnahmen wurden Radioaktivitätsabklingkurven berechnet. Diese stoffwechselkinetischen Untersuchungen wurden sowohl vor dem Gentransfer mit Ad-CMV-hLDL-R als auch danach

durchgeführt.

4.5.1 Radioiodmarkierung

Aus dem Blut normolipämischer Patienten wurden für stoffwechselkinetische Untersuchungen mittels Ultrazentrifugation humane LDL gewonnen, radioiodiert und in WHHL-Kaninchen injiziert. Hierfür wurde 1 mg frisch isoliertes LDL (in 1M Glycin-Puffer, pH 10) mit Na^{125}I sowie ICl-Lösung versetzt. Die radiochemische Ausbeute der Markierung betrug 22%.

4.5.2 Stoffwechselkinetik vor Gentransfer

Der Radiomarkierung der Proteine schloß sich die Inkubation mit autologem Kaninchenserum an. Die Injektion der markierten Proteine 68 Tage vor Gentransfer erfolgte über die Ohrvene der Kaninchen. Es folgten Blutentnahmen mit Serumisolierung 5 Minuten sowie 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48 und 72 Stunden post injectionem. Aus diesen Seren wurden anschließend Aliquots zur quantitativen Bestimmung der Radioaktivität gewonnen.

Abbildung 14 zeigt den Anteil der Radioaktivität im Serum der Kaninchen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion der markierten Proteine. 72 Stunden post injectionem konnte ein Absinken der Aktivität im Kaninchenserum auf Werte zwischen 21,1 und 23,0% des Ausgangswertes dokumentiert werden, es zeigte sich für alle Kaninchen eine nahezu identische Radioaktivitätsabklingkurve.

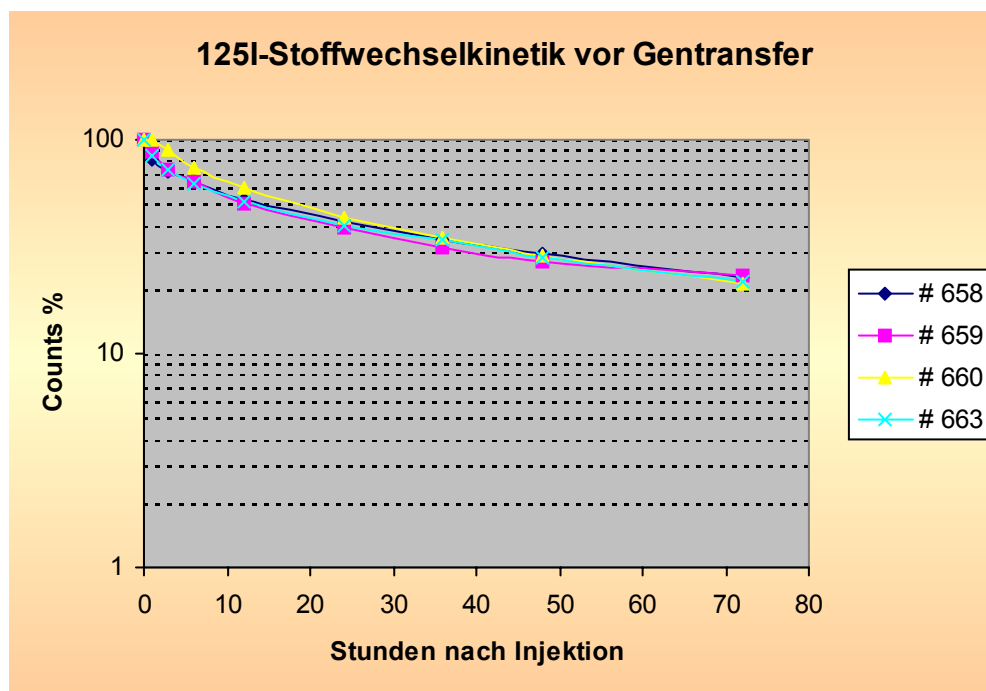


Abbildung 14: Stoffwechselkinetik vor Gentransfer nach Injektion von humanem ^{125}I -LDL.

4.5.3 FPLC-Analyse der Lipoproteinverteilung im Kaninchenserum vor Gentransfer

Um die Lipoproteindistribution im Serum zu bestimmen, eignet sich die FPLC-Analyse mit einer Superose-6-Säule. Diese trennt nach dem Prinzip der Gelfiltration die Serumbestandteile nach ihrer Größe auf. Da sie einen enorm weiten Trennbereich bietet, ist sie für die Trennung von Lipoproteinen besonders geeignet. In den vorangehenden Untersuchungen waren bereits die Aktivitätsprofile der FPLC-Analyse von Kaninchenserum und Humanserum verglichen worden. Hierbei konnte eine Übereinstimmung des Aktivitätspeaks für Human-LDL und Kaninchen-LDL aufgezeigt werden [6].

Abbildung 15 zeigt die FPLC-Analyse der Lipoproteinverteilung in den Kaninchenseren vor Genterapie. Die linke Abbildung stellt hierbei die Distribution des Gesamtcholesterins dar. Man kann deutlich zwei Peaks erkennen, wobei der erste, flachere die VLDL-Fraktion und der zweite, höhere die LDL-Fraktion repräsentiert. Die Überhöhung der LDL-Fraktion ist dabei sowohl für das WHHL-Kaninchen als auch für Patienten mit FH typisch, während die VLDL-Fraktion und die in der rechten Abbildung dargestellten Triglyzeride relativ niedrig sind.

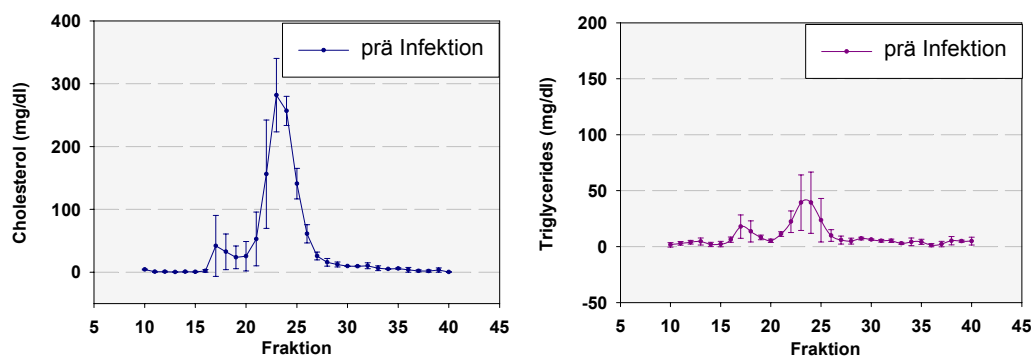
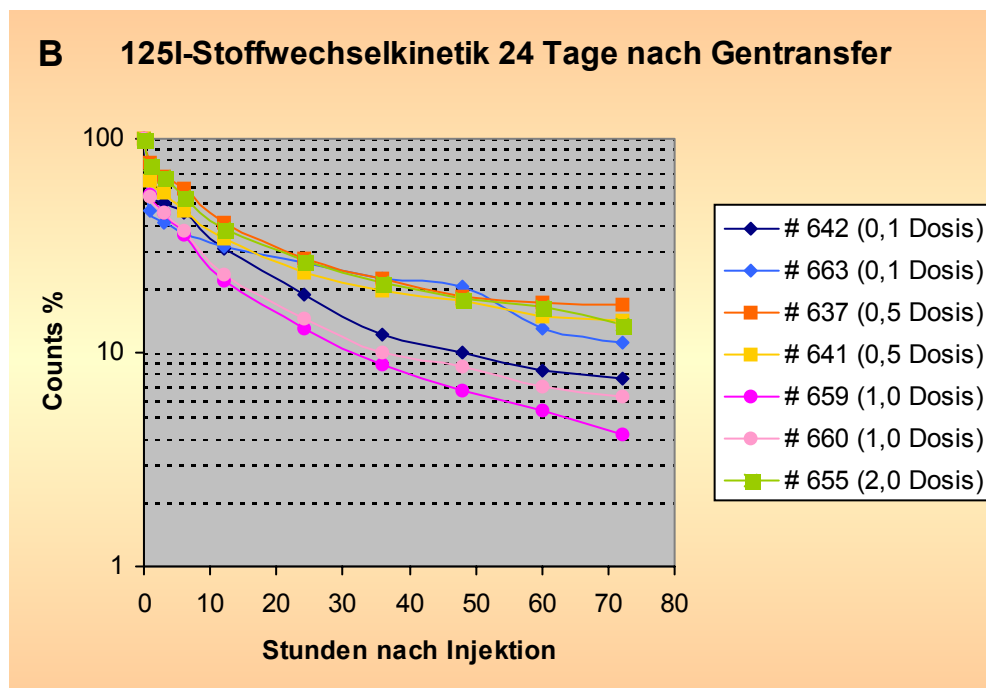
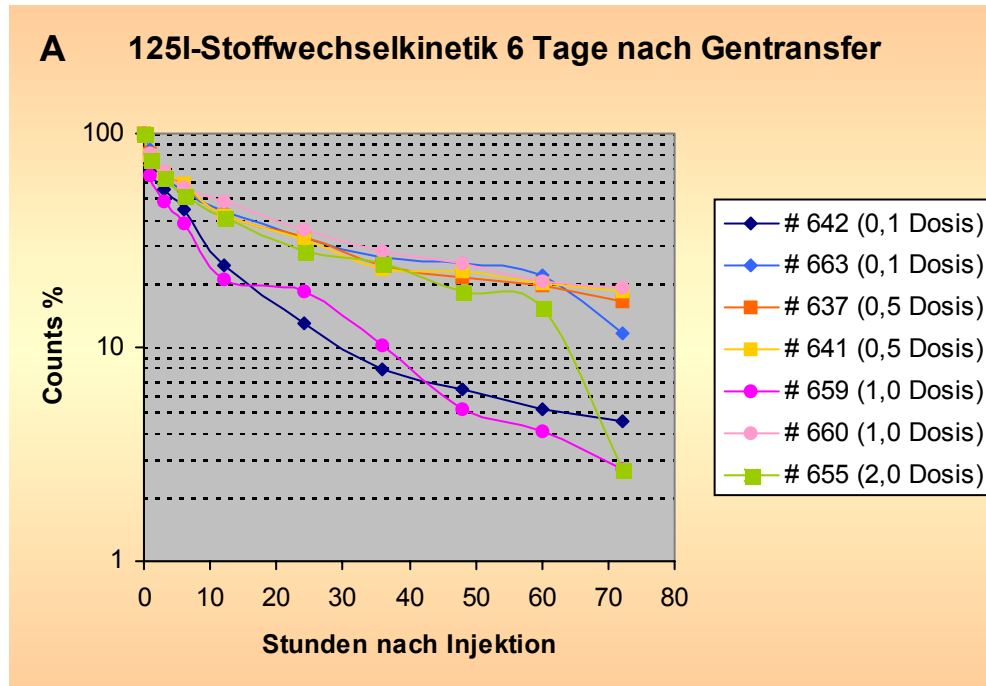


Abbildung 15: FPLC-Analyse der Kaninchenseren (1fache Dosis) vor Genterapie. In der linken Abbildung ist die Verteilung des Gesamtcholesterins dargestellt. Deutlich ist die erhöhte LDL-Fraktion (2. Peak) zu erkennen, die für die WHHL-Kaninchen typisch ist, die VLDL-Fraktion (1. Peak) und die Triglyzeride (rechte Abbildung) sind verhältnismäßig niedrig.

4.5.4 Stoffwechselkinetik nach Gentransfer mit Ad-CMV-hLDL-R

Nach Gentransfer mit dem humanen LDL-Rezeptor wurden erneut Stoffwechselkinetiken durchgeführt, um die Veränderungen im Metabolismus der humanen LDL zu erfassen. Hierfür erfolgte die neuerliche Markierung humaner LDL mit dem Iodisotop ^{125}I sowie die nachfolgende Injektion in die nun gentherapierten WHHL-Kaninchen. Aus den sich anschließenden Blutentnahmen wurden wieder Aliquots hergestellt und Radioaktivitätsabklingkurven berechnet.



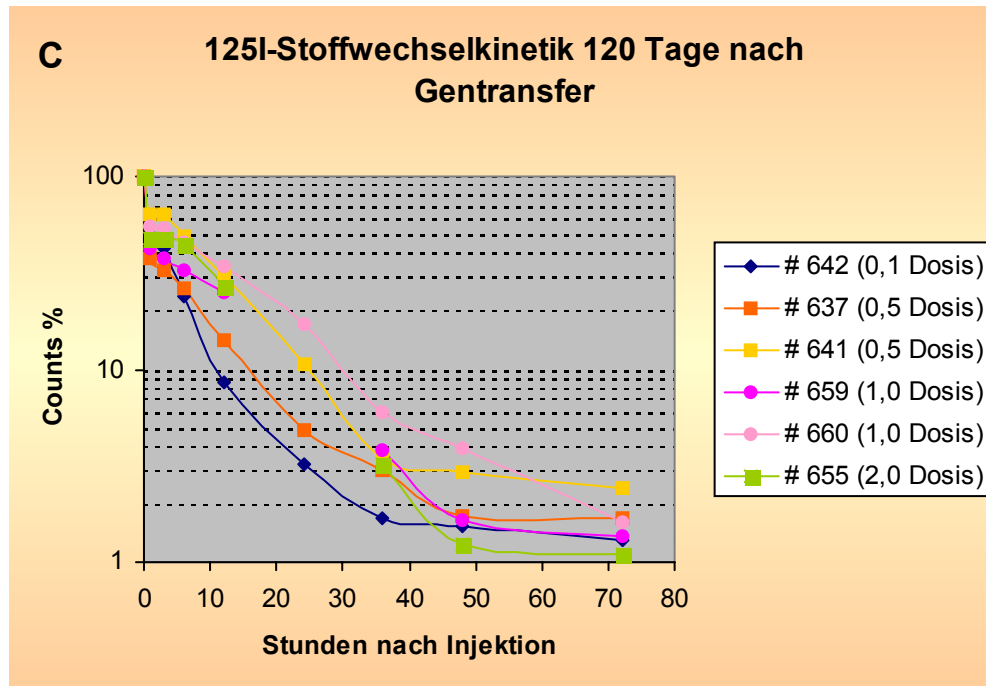


Abbildung 16: Stoffwechselkinetiken 6, 24 und 120 Tage nach Gentransfer mit Ad-CMV-hLDL-R nach Injektion von humanem ¹²⁵I-LDL.

Abbildung 16 zeigt den Anteil der Radioaktivität im Serum der Kaninchen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Injektion der markierten Proteine. Prinzipiell belegen die Radioaktivitätsabklingkurven bei allen Tieren einen funktionell intakten transgen exprimierenden LDL-Rezeptor durch eine erhöhte katabole Rate der injizierten radiomarkierten LDL, d.h. die humanen LDL können von der Leber der Kaninchen nun aufgenommen und metabolisiert werden. Dieser Effekt läßt sich auch 120 Tage nach Gentransfer noch nachweisen, allerdings scheint er von der gewählten Virusdosis unabhängig zu sein, da sich bei den mit höheren Virusmengen therapierten Tieren nicht zwangsläufig eine höhere katabole Rate der LDL aufzeigen läßt als bei den Tieren, die nur eine geringe Virusmenge erhielten.

4.5.5 FPLC-Analyse der Lipoproteinverteilung im Kaninchenserum nach Gentransfer mit Ad-CMV-hLDL-R

Die Lipoproteindistribution in den Kaninchenserum wurde zu definierten Zeitpunkten nach Genthherapie (4, 10, 17 und 24 Tage danach) abermals mittels FPLC-Analyse untersucht.

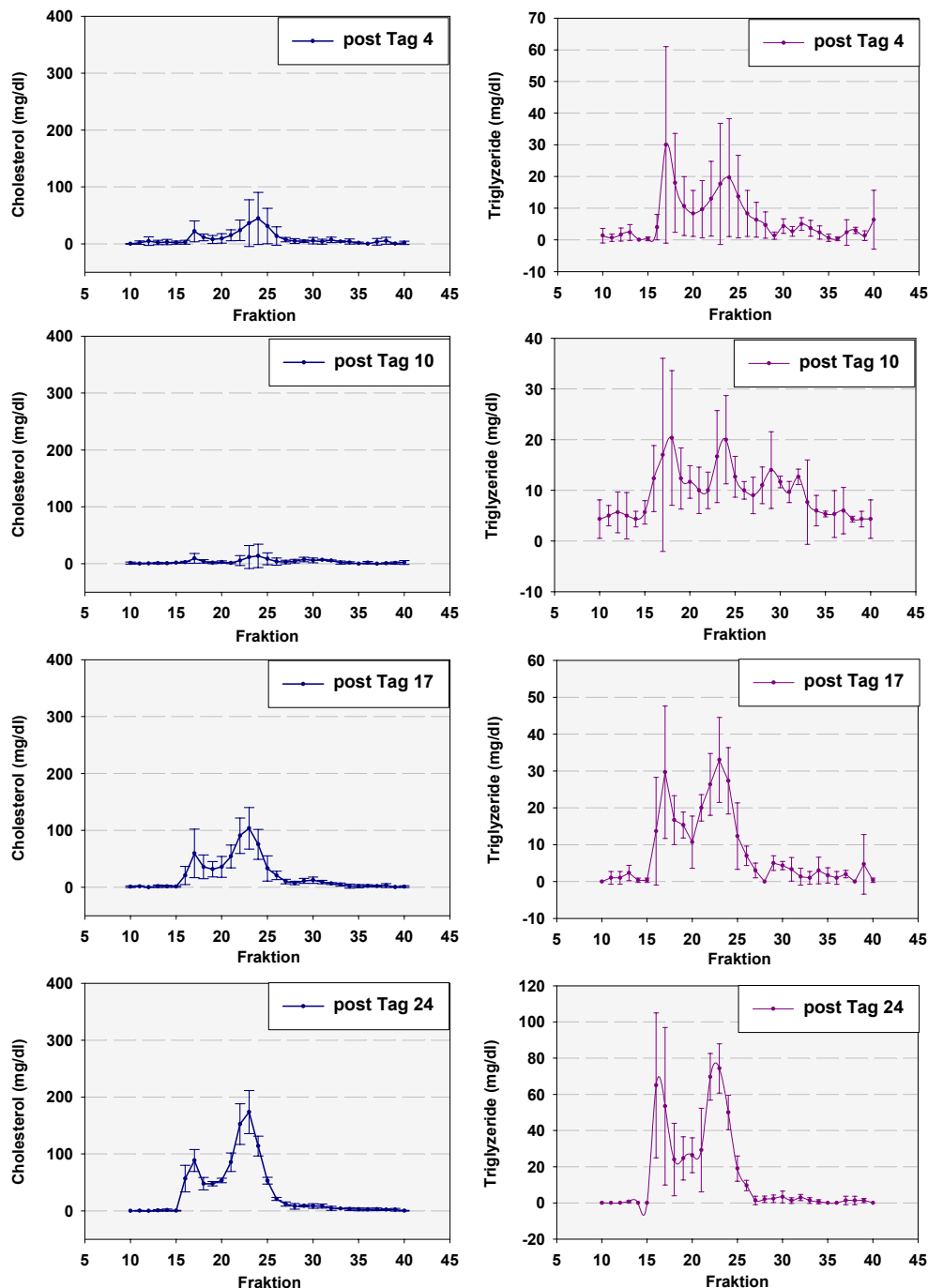


Abbildung 17: FPLC-Analyse der Kaninchenserum (1fache Dosis) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Genthherapie mit Ad-CMV-hLDL-R. Es wird ein deutlicher Abfall der cholesterinreichen LDL-Fraktion (linke Abb., 2. Peak) bei gleichzeitigem Anstieg der triglyzeridreichen VLDL-Fraktion (linke Abb., 1. Peak und rechte Abb.) deutlich. Dieser Effekt läßt zwar allmählich nach, ist aber vier Wochen nach Genthherapie noch immer zu erkennen.

Abbildung 17 stellt hierbei in der linken Abbildung wieder die Verteilung der Gesamtcholesterinserumkonzentration dar. Erneut sind hier zwei Peaks zu erkennen, wobei der erste, flachere wieder die VLDL-Fraktion und der zweite, höhere wieder die LDL-Fraktion repräsentiert. Die rechte Abbildung zeigt die Triglyzerid-Fraktion. Im Gegensatz zu den FPLC-Analysen, die vor Gentherapie erhoben wurden (Abb. 15), kann bereits vier Tage nach Gentherapie eine deutliche Reduktion der cholesterinreichen LDL-Fraktion beobachtet werden, welche auch nach vier Wochen noch nachweisbar ist. Begleitend wird ebenfalls ab dem 4. Tag nach Gentherapie ein deutlicher Anstieg der triglyzeridreichen VLDL-Fraktion offenbar, welcher auch mindestens vier Wochen lang anhält. Dies zeigt, dass die Leber die nach dem Gentherapie erhöhte Cholesterinzufuhr mit einer vermehrten VLDL-Synthese kompensiert.

4.6 Scanuntersuchungen

4.6.1 LDL-Radiomarkierungen mit ^{111}In Indium

Aus dem Serum normolipämischer Probanden wurden für die Scanuntersuchungen jeweils frisch LDL mittels Ultrazentrifugation isoliert und mit ^{111}In radiomarkiert. Dazu wurde LDL (1 mg in 1 ml PBS) mit DTPA im Verhältnis 1:1 gekoppelt und dann mit ^{111}In versetzt. Die radiochemische Ausbeute der Markierung betrug 10-35%.

4.6.2 Scanuntersuchung vor Gentherapie

Zur Durchführung der Scanuntersuchungen wurden die Kaninchen sediert und jeweils paarweise bäuchlings auf dem Detektor gelagert. Anschließend wurden jedem Tier etwa 3,5-5,0 MBq humane ^{111}In -LDL via Ohrvene peripher-venös injiziert, welche zuvor mit autologem Kaninchenserum inkubiert worden waren. Nachfolgend wurden in der ersten Stunde post injectionem Scanaufnahmen in dynamischer Form als einminütige Bilder aufgenommen. Danach wurden statische 15-minütige Aufnahmen zu den Zeitpunkten 4 und 24 Stunden nach Injektion angefertigt.

Abbildung 18 zeigt die Scanaufnahme eines WHHL-Kaninchens vor Gentherapie, welche in der Blutpool-Phase der ersten Stunde nach Injektion der ^{111}In -LDL angefertigt wurde. Das Tier wurde auf dem Bauch liegend von unten aufgenommen, wobei am oberen Bildrand der Kopf des Tieres dargestellt wird und das Hinterteil des Kaninchens in Richtung des unteren Bildrandes

weist. Man erkennt im oberen Bereich die stark durchblutete Herzregion, worunter sich ein etwas weniger anreichernder Bereich demarkiert, der der Leber entspricht. Weiter kaudal gelegen kommen die Nieren als zwei Punkte zur Darstellung, deren Anreicherung wiederum etwas schwächer als die der Leber ist. Im unteren Bereich der Abbildung wird ein stark anreicherndes Areal sichtbar, das der mit freiem ^{111}In gefüllten Blase entspricht. Während der Radiomarkierung verbleibt immer etwas nicht gebundenes, freies Indium in der Probe, welches mit injiziert und sofort über Nieren und Blase wieder ausgeschieden wird, was damit zu einer Anreicherung dieser Organe führt. In der Medianlinie des Kaninchens ausgehend vom Herz-Lungenbereich senkrecht nach unten projizieren sich Aorta und Vena cava als blaue Linie.

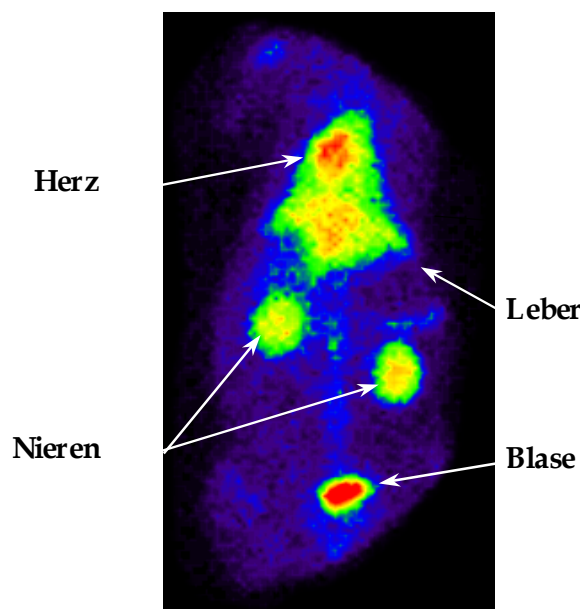


Abbildung 18: Definition der „Regions of Interest“ (ROI): Scanabbildung eines WHHL-Kaninchens nach Gabe ^{111}In -markierter LDL vor Gentherapie.

4.6.3 Scanuntersuchungen nach LDL-R-Gentransfer

Die Scanaufnahmen wurden 20 Tage vor sowie 4, 30, 58 und 113 Tage nach Gentransfer erhoben. Dabei wurden die Abstände der Untersuchungen so gewählt, dass mögliche Überlappungen bezüglich der Iod-Kinetiken, welche 68 Tage vor sowie 6, 24 und 120 Tage nach Gentransfer durchgeführt wurden, hinsichtlich gleichartiger Radioaktivitätsspektren minimiert wurden. Die Tiere wurden abermals sediert und zu zweit auf dem Kamerakopf gelagert, es

erfolgte dann erneut die Injektion von 3,5-5,0 MBq humanem und mit autologem Kaninchenserum inkubierten ^{111}In -LDL über die Ohrvene. Nachfolgend wurden Scanaufnahmen in der ersten Stunde in dynamischer Form als einminütige Bilder aufgenommen sowie statische Aufnahmen über 15 Minuten zu den Zeitpunkten 4 und 24 Stunden nach Injektion angefertigt.

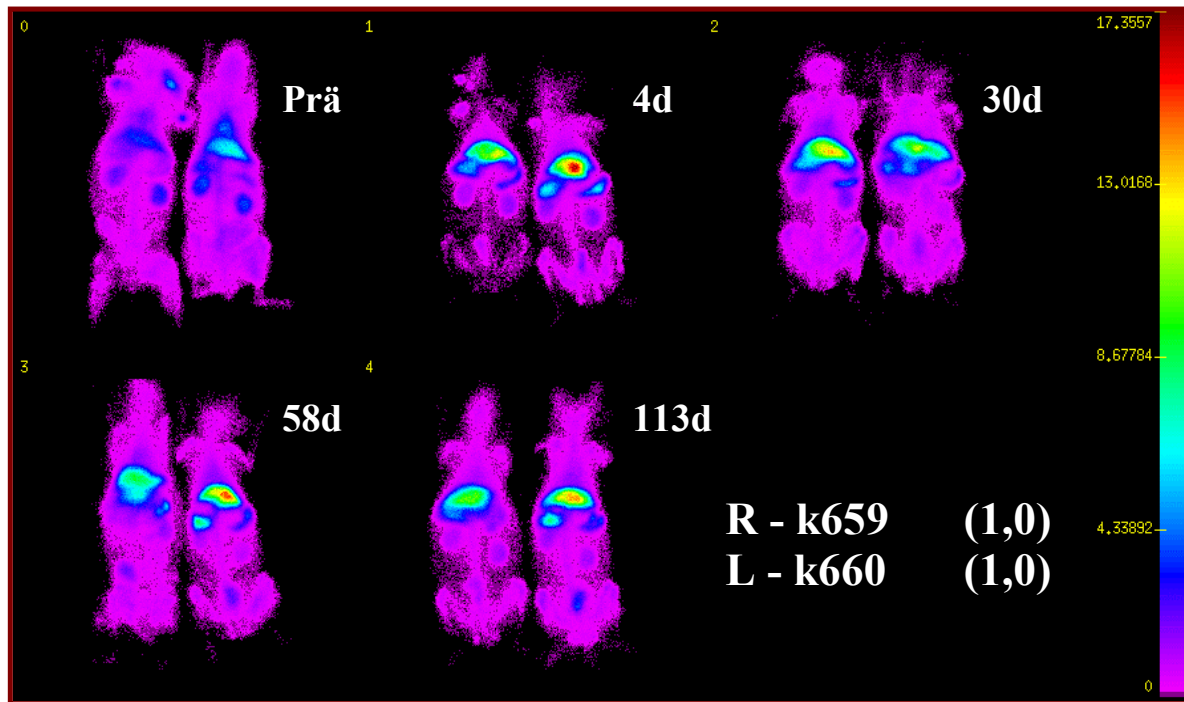


Abbildung 19: Scanaufnahme zweier gentherapierter Kaninchen (1fache Dosis) zu den Zeitpunkten vor Gentherapie (prä) sowie 4, 30, 58 und 113 Tage nach Gentransfer.

Abbildung 19 zeigt die Scanaufnahmen zweier WHHL-Kaninchen, die mit der einfachen Virusdosis behandelt wurden vor Gentherapie sowie 4, 30, 58 und 113 Tage danach. Alle Aufnahmen wurden 4 Stunden nach der Injektion des ^{111}In -LDL vorgenommen, da sich dies als der günstigste Untersuchungszeitpunkt erwies. Die Kaninchen wurden auf dem Bauch liegend von unten aufgenommen, wobei der Kopf zum oberen Bildrand und das Hinterteil zum unteren Bildrand gerichtet ist. Man erkennt auf der Aufnahme vor Gentherapie im oberen Bereich die stark durchblutete Herzregion sowie darunter einen etwas weniger anreichernden Bereich, der der Leber entspricht. Kaudal davon demarkieren sich als zwei seitlich zueinander verlagerte Punkte die Nieren und im untersten Bezirk ein hier nur schemenhaft anreicherndes Areal, welches der mit freiem ^{111}In gefüllten Blase entspricht. Etwa in der Medianlinie finden sich nach kaudal ziehend Aorta und Vena cava als bläulich hervortretendes Band. In allen nach Gentransfer angefertigten Aufnahmen zeigt sich hingegen die stärkste Anreicherung im Bereich der Leber, auch die Nieren und die Blase lassen sich noch relativ gut darstellen, wenngleich sie

auch weniger anreichern als die Leber. Dieser Effekt beruht auf der Tatsache, dass es beim Abbau Indium-markierter Proteine zu einem lysosomalen Freisetzen des ungebundenen Indiums kommt. Hierbei wird freies Indium zellulär sezerniert, glomerulär filtriert und tubulär rückresorbiert, was immer auch zu einer Darstellung des Urogenitaltraktes führt. Die auf den prä-Aufnahmen gut sichtbare Herzregion tritt auf den Aufnahmen nach Gentherapie hingegen in den Hintergrund.

Insgesamt lässt sich eine deutliche Aktivitätsanreicherung der ^{111}In -LDL in der Leber zu allen Zeitpunkten nach Gentherapie erkennen, selbst 113 Tage nach dem Gentransfer scheinen die LDL selektiv in der Leber zu akkumulieren. Wie bereits in vorangegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, ist die Indium-markierte Aufnahme von LDL in die Leber spezifisch durch den Gentransfer des humanen LDL-R vermittelt [6].

Abbildung 20 zeigt die Scanaufnahmen zweier Tiere, die mit 1/10 bzw. der doppelten Virusdosis therapiert worden waren, ebenfalls zu den Zeitpunkten vor Gentransfer und 4, 30, 58 und 113 Tage nach Therapie.

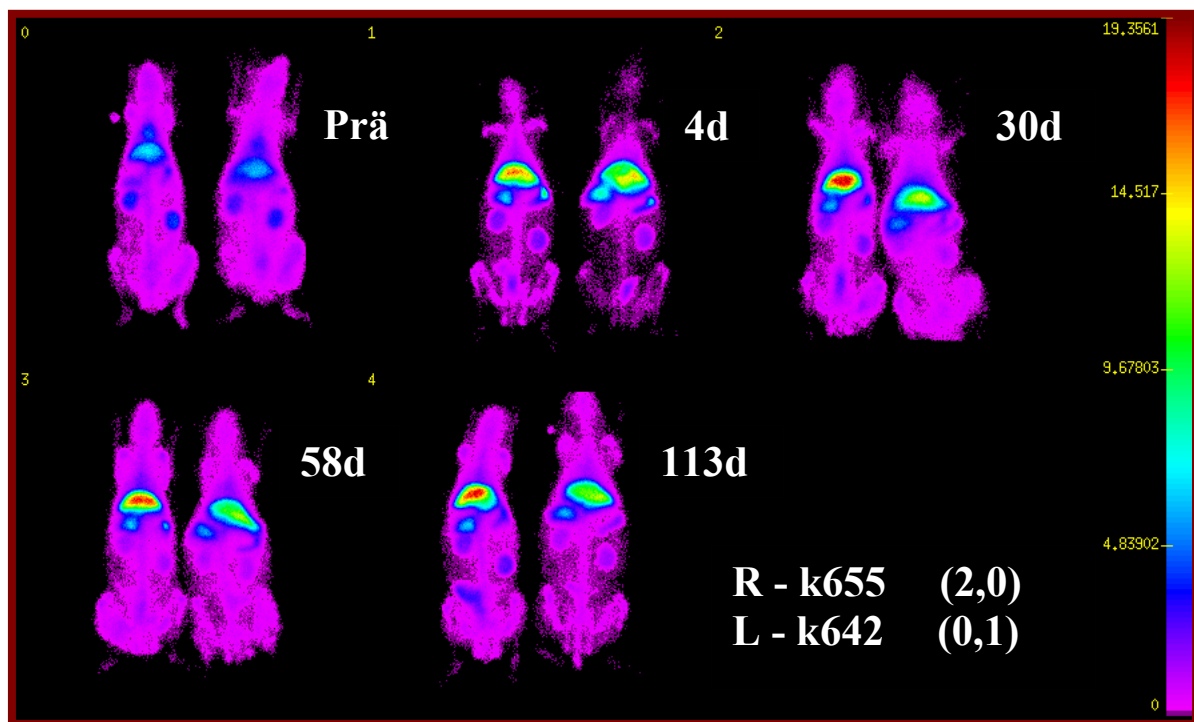


Abbildung 20: Scanaufnahme zweier gentherapierter Kaninchen (1/10 Dosis und 2fache Dosis) zu den Zeitpunkten vor Gentherapie (prä) sowie 4, 30, 58 und 113 Tage nach Gentransfer.

Die Aufnahmen vor Gentransfer entsprechen im wesentlichen denen der Abbildung 19. Auch in den nach Gentherapie angefertigten Bildern lassen sich vergleichbare Ergebnisse wie bei den mit

einfacher Dosis behandelten Tieren erkennen. Es kommt zu einer starken Aktivitätsanreicherung in der Leber und geringer auch der Nieren und Blase bei gleichzeitig schwächerer Darstellung der gut durchbluteten Herzregion, was erneut für eine selektive Akkumulation der markierten LDL in der Leber spricht. Abermals ist dieser Effekt auch 113 Tage nach Gentransfer noch nachweisbar, ein früheres Nachlassen des therapeutischen Effektes in dem mit lediglich 1/10 der Virusdosis therapierten Kaninchen läßt sich nicht aufzeigen.

4.6.4 Quantifizierung des Gentransfers

Die Leber/Herz-Ratio (L/H-Ratio) stellt ein Maß für die spezifische Anreicherung der applizierten Radioaktivität in den einzelnen Organen dar. Die über der Leber gemessene Radioaktivität wird hierbei zu der über dem Herzen gemessenen in Relation gesetzt, wobei sich im zeitlichen Verlauf beurteilen läßt, ob sich ein differierendes Verhalten der ^{111}In -LDL einstellt. Tabelle 8 zeigt die 4 bzw. 24 Stunden nach ^{111}In -LDL-Injektion erhobenen L/H-Ratios für die verschiedenen Untersuchungszeitpunkte, wobei jeweils ein dosisunabhängiger Mittelwert aller zum jeweiligen Zeitpunkt gescannten Tiere verwendet wird.

4 h p.i.			
	Mittelwert	Standardabweichung	Anzahl (n)
L/H-Ratio, -20	1,5	0,2	8
L/H-Ratio, 4	11,3	1,7	7
L/H-Ratio, 30	7,0	1,5	6
L/H-Ratio, 58	6,0	1,1	6
L/H-Ratio, 113	7,3	0,9	6

24 h p.i.			
	Mittelwert	Standardabweichung	Anzahl (n)
L/H-Ratio, -20	3,2	0,4	8
L/H-Ratio, 4	14,2	2,0	7
L/H-Ratio, 30	9,2	1,4	6
L/H-Ratio, 58	8,9	0,7	4
L/H-Ratio, 113	8,2	2,5	6

Tabelle 8: L/H-Quotienten 4 bzw. 24 Stunden nach ^{111}In -LDL-Injektion zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Gentransfer.

Vergleicht man die vier Tage nach LDL-R-Gentransfer erhobenen Daten mit denen vor Therapie, so läßt sich eine signifikante Erhöhung der L/H-Ratio aufzeigen, was für eine

vermehrte ^{111}In -LDL-Akkumulation in der Leber als Ausdruck einer erfolgreichen LDL-R-Exprimierung spricht. Zu den nachfolgenden Zeitpunkten läßt sich zwar ein allmähliches Absinken des L/H-Quotienten dokumentieren, allerdings lassen sich auch zum letzten Untersuchungszeitpunkt nach 113 Tagen noch immer deutlich über den Vorgrößen liegende Zahlen nachweisen. Abbildung 21 stellt diese Ergebnisse graphisch dar.

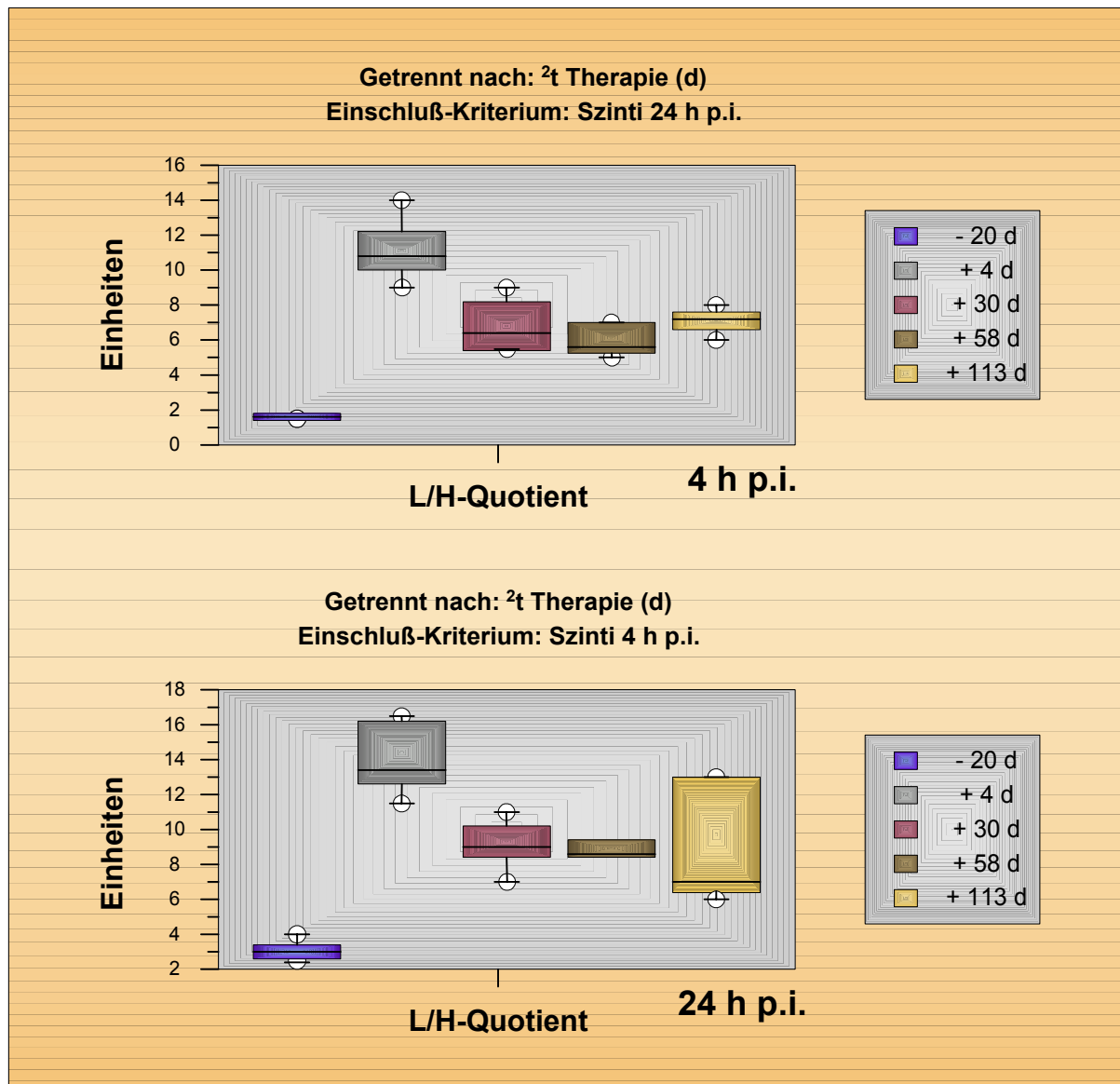


Abbildung 21: Dosisunabhängige Darstellung der L/H-Ratio 4 bzw 24 Stunden nach Injektion von ^{111}In -LDL zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Vektorapplikation. Deutlich ist der Zuwachs der Aktivitätsanreicherung in der Leber nach LDL-R-Gentransfer. Am stärksten ausgeprägt ist dieser Effekt nach 4 Tagen, allerdings ist auch 113 Tage nach Vektorgabe noch ein signifikanter Erfolg der Therapie erkennbar.

Um zu bestimmen, ob eine höhere Vektordosis auch mit einem stärkeren Anstieg des L/H-

Quotienten vergesellschaftet ist, wurden die L/H-Quotienten der einzelnen Kaninchen vor und nach Therapie gegenübergestellt. Abbildung 22 illustriert hierbei den individuellen Verlauf der L/H-Ratio der einzelnen Tiere, Abbildung 23 faßt die Ergebnisse etwas allgemeiner für jeweils alle Tiere einer verwendeten Vektordosis zusammen. Hierbei wird abermals ersichtlich, dass der maximale Therapieeffekt am 4. Tag nach Gentransfer aufzuzeigen ist, eine positive Korrelation zwischen Virusdosis und L/H-Quotient ergibt sich jedoch nicht.

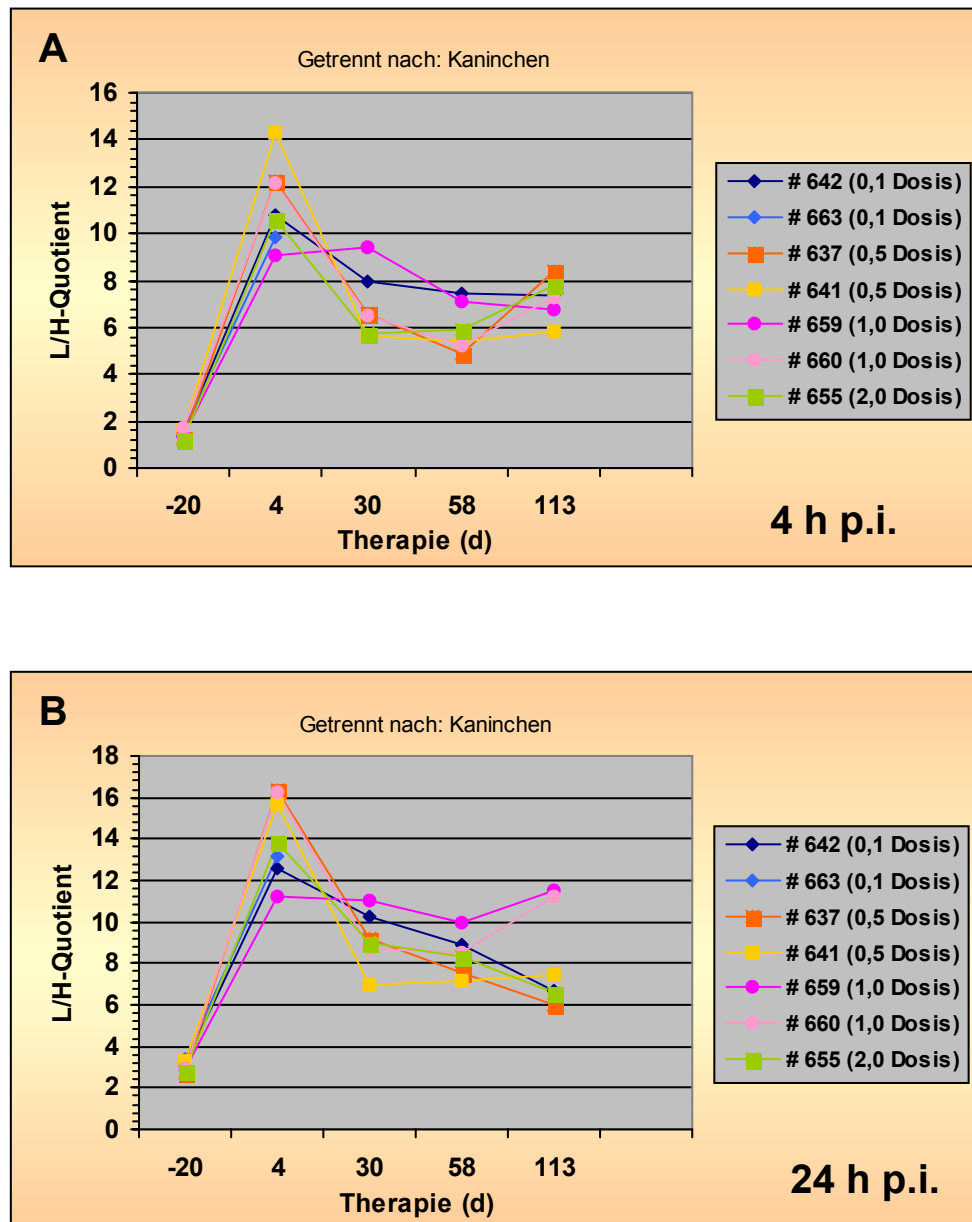


Abbildung 22: Individueller Verlauf der L/H-Ratio der einzelnen Kaninchen 4 h (Abbildung A) bzw. 24 h (Abbildung B) nach Injektion radiomarkierter LDL zu definierten Zeitpunkten vor und nach Gentherapie.

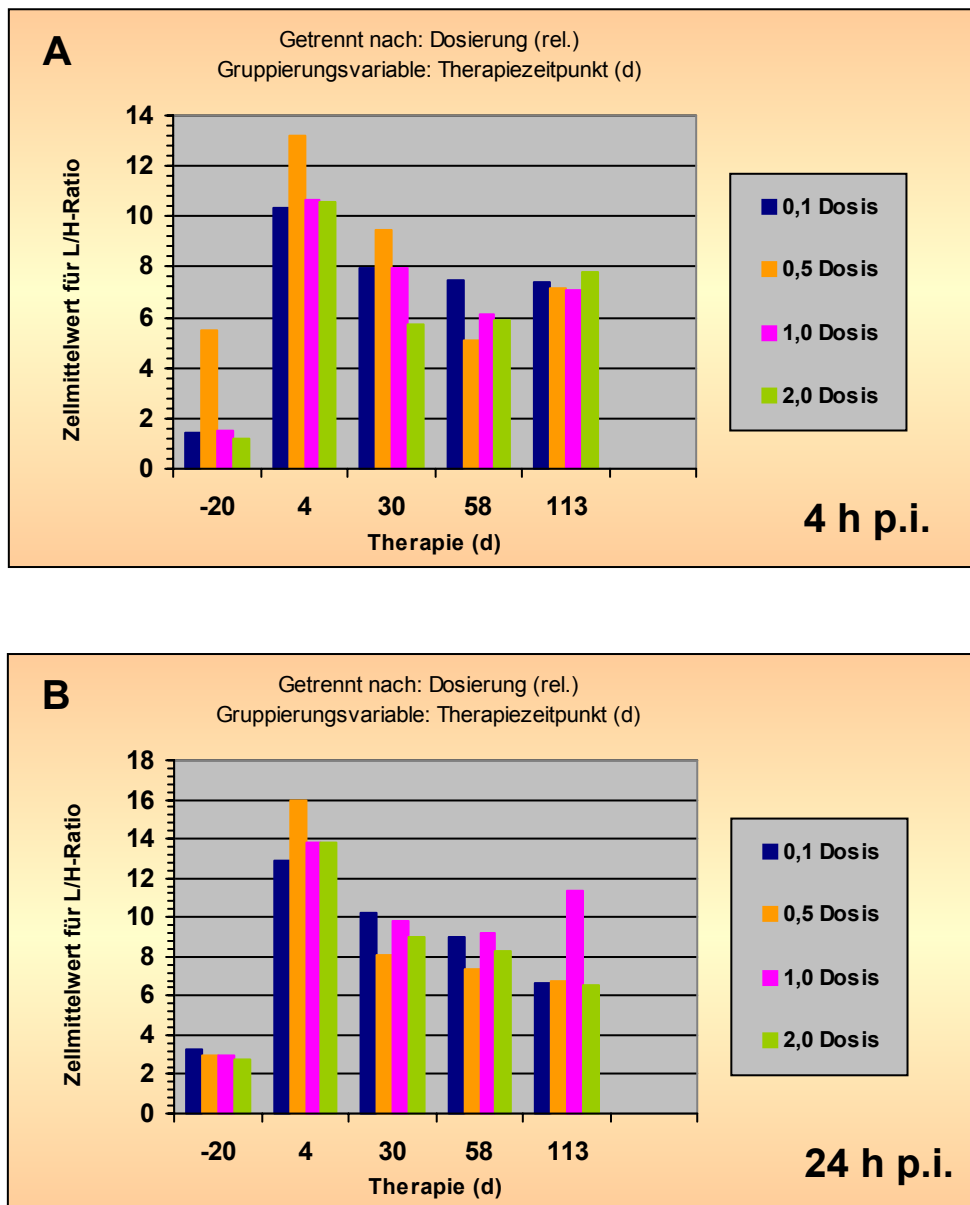


Abbildung 23: Allgemeine dosisabhängige Darstellung des Zellmittelwertes der L/H-Ratio 4 h (Abbildung A) bzw. 24 h (Abbildung B) nach Injektion radiomarkierter LDL zu definierten Zeitpunkten vor und nach Gentransfer.

4.6.5 Bestimmung des günstigsten Untersuchungszeitpunktes

Betrachtet man die Abbildungen 21 bis 23, so fällt auf, dass die L/H-Ratio 24 p.i. der radiomarkierten LDL zwar höher ist als nach 4 h, dass aber 4 h p.i. auch schon ein für Scanuntersuchungen geeigneter hoher Leber-Uptake stattfindet. Da ein zeitnah zur LDL-Applikation durchgeführter Scan organisatorische Vorteile bietet und damit zudem die Möglichkeit offensteht, künftig auch Radioisotope mit kürzerer Halbwertszeit zu verwenden, scheint der Untersuchungszeitpunkt 4 h p.i. der günstigste zu sein.

5. DISKUSSION

Die autosomal-dominant vererbte Familiäre Hypercholesterinämie (FH) zählt zu den häufigsten monogenetischen Stoffwechselkrankheiten und wird durch eine Defizienz des LDL-Rezeptors (LDL-R) verursacht. Beim Gesunden findet sich dieser zu 70-80% in der Leber. Der Leber kommt somit ursächlich und im Rahmen therapeutischer Bemühungen eine zentrale Rolle zu [103]. Klinisch zeichnet sich die Erkrankung neben einem erhöhten Gesamt- und LDL-Cholesterin sowie einer Xanthomatose der Sehnen und der Haut vor allem durch eine prämatüre Atherosklerose aus, wobei insbesondere die Koronarsklerose einen frühzeitigen Tod bedingt. Heterozygote FH-Patienten entwickeln die ersten klinischen Symptome in der Regel zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr und weisen LDL-Cholesterinserumkonzentrationen zwischen 200-400 mg/dl auf, hier kann der Krankheitsprogress durch intensive medikamentöse Therapie und regelmäßige Lipidapheresen meist deutlich verzögert werden. Homozygot Erkrankte hingegen weisen exzessiv erhöhte LDL-Cholesterinserumkonzentrationen von 400-1.000 mg/dl auf und erkranken bereits im Kindesalter an den Folgeerscheinungen, was zum Tod meist vor dem 20. Lebensjahr führt [10, 12, 13, 16, 27]. Für diese Patienten stellt im Einzelfall die Lebertransplantation das einzige therapeutisch ausreichende Mittel dar [42-44, 104, 105, 118].

Die FH diene uns als Modell zur Etablierung Leber-gezielter Gentransferversuche, als Tiermodell wurden hierbei Watanabe Heritable Hyperlipidemic (WHHL)-Kaninchen eingesetzt. Kaninchen werden bereits seit Jahrzehnten für tierexperimentelle Untersuchungen des Lipidstoffwechsels verwendet, da ihr Lipoproteinmetabolismus trotz der imponierenden HDL-Fraktion dem des Menschen relativ ähnlich ist [53, 106, 107]. Die WHHL-Kaninchen weisen zudem einen LDL-Rezeptordefekt auf, der mit einer deutlichen Elevation der Plasma-LDL-Konzentration bis zu 1.000 mg/dl vergesellschaftet ist und so eine prämatüre Atherosklerose hervorruft, darüber hinaus kommt es wie bei FH-Patienten zur Ausbildung von Xanthomen [33, 34, 47, 53-57]. Insgesamt bedingen die genannten Veränderungen innerhalb der ersten drei Lebensjahre den Tod des Tieres. Die Ursache des natürlich vorkommenden, charakterisierten Defekts ist eine 12 Nukleotide lange in-frame-Deletion des LDL-Rezeptorgens, welche zu einem Verlust von vier Aminosäuren in der Ligandenbindungsdomäne und damit zu einem funktionsunfähigen Genprodukt führt [50, 54]. Dieses bedingt deutliche phänotypische Parallelen zur FH, so dass WHHL-Kaninchen ein hervorragendes Tiermodell für die Familiäre Hypercholesterinämie darstellen und sich für Leber-gezielte Gentransferversuche anbieten.

Ein anderes zur Verfügung stehendes Tiermodell stellen die LDL-R knockout Mäuse dar, die durch LDL-R-Gen-Disruption generiert werden können. Durch Fütterung einer cholesterinreichen Diät können diese Tiere zwar ein klinisches Krankheitsbild entwickeln, das dem der FH ähnelt, insgesamt bestehen aber doch noch deutliche Unterschiede gegenüber dem menschlichen Fettstoffwechsel, so dass die WHHL-Kaninchen besser als Tiermodell geeignet scheinen [63, 79-81, 108, 109].

Darüber hinaus sind erste Versuchsreihen in den USA auch an Primaten gestartet worden, die zwar prinzipiell als Vorläufer von Gentherapieversuchen am Menschen Erfolg versprechend sind, aber noch einer ausreichenden klinischen Etablierung bedürfen [110-113, 118].

Zahlreiche präklinische *ex vivo*- und *in vivo*-Versuchsreihen mit WHHL-Kaninchen im Rahmen gentherapeutischer Bemühungen der FH wurden in den vergangenen Jahren beschrieben. Während bei der *ex vivo*-Strategie die Gentherapie mit einer Leberzelltransplantation kombiniert wird, werden bei den *in vivo*-Ansätzen rekombinante Gene direkt oder mittels eines geeigneten Vektors in den Probandenkörper eingebracht. Das allgemeine Vorgehen bei der *ex vivo*-Strategie beruht auf der Entnahme von Hepatozyten aus dem Organismus, ihrer Kultivierung und Transfektion mit das LDL-Rezeptorgen tragenden Retroviren sowie der nachfolgenden Retransplantation. Das Paradigma wurde Ende der achtziger Jahre von Wilson et al. geliefert. Hierbei wurden WHHL-Kaninchen Hepatozyten entnommen, kultiviert und mit einem rekombinanten Retrovirus transduziert, welcher das Gen für den humanen LDL-R enthielt. Die so modifizierten allogenen Leberzellen wurden anschließend den Tieren via Portalvene reimplantiert, was zu einem signifikanten Abfall der Serumcholesterinkonzentration von bis zu 70% für einen Zeitraum von sechs Tagen führte [47-50, 118, 119]. Die Annahme, dass die nur vorübergehende Genexpression Ausdruck einer Abstoßungsreaktion gegen die allogenen Leberzellen sein könnte, führte zur Verwendung autologer Hepatozyten. So führten Chowdhury et al. 1991 bei einer Reihe von WHHL-Kaninchen partielle Hepatektomien durch und kultivierten die so gewonnenen Hepatozyten. Nach genetischer Korrektur durch einen das LDL-Rezeptorgen eines Wildtyp-Kaninchens tragenden Retrovirus wurden diese dem jeweiligen Tier gleichfalls transplantiert, was immerhin über einen Zeitraum von vier Monaten zu einer Serumcholesterinsenkung von 25-45% führte. Hinweise für eine serologisch faßbare Abstoßungsreaktion gegen das Genprodukt ergaben sich nicht [47, 51, 118-120].

Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurden die ersten *in vivo*-Gentherapieversuche Anfang der neunziger Jahre gestartet. So beschrieben Wilson et al. die erfolgreiche Durchführung eines leberspezifischen Gentransfers im WHHL-Kaninchen durch Verwendung eines DNA-Protein-

Komplexes, der ein humanes LDL-Rezeptorgen enthielt und den Tieren peripher-venös direkt injiziert wurde. Es ließ sich ein Hepatotropismus des Konstruktes nachweisen und die Bildung rekombinanter LDL-R-RNA aufzeigen, deren Menge etwa 2-4% der Norm erreichte. Hinsichtlich des Lipidstoffwechsels äußerte sich dies in einer Senkung des Serumcholesterinspiegels von 25-30%, welche bis sechs Tage nach dem Gentransfer anhielt [59, 118, 120]. Bei anderen Ansätzen von Wilson et al., Li et al. sowie Brown et al. wurde WHHL-Kaninchen ein rekombinanter Adenovirus infundiert, welcher LDL-R-cDNA enthielt. Auch hierbei ließ sich ein deutlicher Hepatotropismus nachweisen, zudem war das Ausmaß der erreichten rekombinanten LDL-Rezeptorgenexpression wesentlich größer als in dem vorgenannten Versuch. Metabolisch konnte eine Reduktion der Gesamt- und LDL-Serumcholesterinkonzentration beobachtet werden, die ihr Maximum nach ca. einer Woche erreichte und für etwa zwei Wochen anhielt. Der Nachweis des Gentransfers erfolgte bei Wilson et al. indirekt über eine Radiomarkierung des Vektors mit anschließender Aufzeichnung der Radioaktivitätsanreicherung in den verschiedenen Organen, wobei eine vermehrte hepatische Anreicherung dokumentiert werden konnte. Zusätzlich wurde die hepatische Expression des humanen LDL-R mittels LDL-Rezeptor-mRNA-Nachweis aufgezeigt. Der Versuch einer Optimierung dieser Ansätze resultierte in Cholesterinsenkungen von bis zu 60% über einen Zeitraum von 100 Tagen [114]. Leider kam es bei der Arbeitsgruppe um Wilson et al. durch die Adenovirusgabe zur Bildung neutralisierender Antikörper, welche den wiederholten Einsatz limitierten [60-62]. Durch den Einsatz von Immunsuppressiva und eine Weiterentwicklung der Vektoren mit zusätzlicher Deletion immunogen wirkender Genabschnitte scheinen jedoch deutlich längere Expressionszeiten möglich [114, 117, 121- 124].

Basierend auf den gewonnenen *ex vivo*-Daten wurde durch Wilson et al. 1992 als Pilotprojekt ein Protokoll zur Durchführung von Gentransferversuchen bei 5 Patienten mit homozygoter FH beantragt [47, 52]. Trotz der sicher noch unzureichend vorliegenden Daten der Tierversuche wurde die Studie durch die Ethikkommission genehmigt. Die Rekrutierung der Patienten erfolgte lediglich auf Grund des klinischen Phänotyps einer homozygoten FH, eine genetische Charakterisierung erfolgte nicht. Aus heutiger Sicht erscheint dies wenig verständlich, da man annehmen muß, daß es neben dem LDL-R-Defekt weitere Störungen des Lipidstoffwechsels gibt, die den Phänotyp einer homozygoten FH bedingen können [115]. Bei den Patienten wurden partielle Hepatektomien durchgeführt, die so gewonnenen Leberzellen kultiviert und dann mit einem das humane LDL-R-Gen tragenden Retrovirus infiziert. Die positiv selektierten autologen Zellen wurden anschließend via Portalvene reinjiziert. Die nachfolgenden

Stoffwechseluntersuchungen konnten bei drei der Patienten eine Beschleunigung des LDL-Katabolismus bis zu 53% sowie eine Senkung des LDL-Cholesterins bis zu 20% aufzeigen. Zwar wurden die Cholesterinwerte noch für mindestens 18 Monate regelmäßig bestimmt, und es zeigte sich eine persistierende LDL-Senkung, da jedoch postoperativ eine passager pausierte Lipidsenkertherapie wieder aufgenommen wurde, muß der tatsächliche Langzeiteinfluß der Gentherapie auf die Cholesterinserumkonzentration offen bleiben. Zwar bewiesen Wilson et al. mit dieser Studie die prinzipielle Durchführbarkeit einer somatischen Gentherapie am Menschen ohne das Auftreten größerer Komplikationen, dennoch sollte vor der erneuten Durchführung eines humanen Gentherapieprotokolls eine Verfahrensoptimierung erfolgen. Denn mit der chirurgischen Entnahme von Hepatozyten stellte dieses Verfahren eine für den Patienten sehr invasive Prozedur dar, darüber hinaus war die Ausbeute der Zahl erfolgreich transfizierter Zellen mit 11-31% relativ gering [52, 116- 118]. Und obwohl weitere Gentherapieversuche bei Patienten mit genetischen Lebererkrankungen schwerwiegende Komplikationen bis hin zu letalen Ausgängen zeigten, sind langfristig modifizierte Gentherapieverfahren im Menschen zu erwarten [125-127].

Grundlage dieser Arbeit bildete die vorangegangene Entwicklung eines externen szintigraphischen Verfahrens in der Arbeitsgruppe von PD Dr. H. Schmidt, welches die Effizienz eines durch Adenoviren vermittelten LDL-R-Gentransfers beim WHHL-Kaninchen *in vivo* darstellen kann [6].

Dem schloß sich diese Arbeit mit der Aufgabenstellung an, den Einfluß einer Virusdosisescalation auf Cholesterinsenkung und Langzeitexpression bei adenoviral vermittelten LDL-Rezeptorgentransferversuchen im *in vivo*-Kaninchenmodell zu untersuchen. Dabei wurde der LDL-R-Gentransfer mittels Adenoviren des Serotyps 5 durchgeführt. Dieser Vektor wird im Rahmen von Gentransferversuchen relativ häufig eingesetzt, da er zum einen einfach und in großen Mengen hergestellt werden kann und zum anderen auch sich nicht mehr teilende Zellen in hoher Zahl infiziert. Unter natürlichen Bedingungen führt der Virus hauptsächlich zu Infektionen des Respirationstraktes, bei systemischer Applikation jedoch zeigt er einen ausgeprägten Hepatotropismus, weshalb er gerne für Leber-gezielte gentherapeutische Fragestellungen verwendet wird [121, 122]. Limitiert wird der Einsatz dieses Serotyps dadurch, dass die eben beschriebenen häufigen Infektionen der oberen Atmungsorgane eine hohe Durchseuchungsrate der Bevölkerung bedingen, so dass eine Vielzahl von Menschen präexistierende Antikörper aufweist. Auch im Tierversuch konnte dieser Effekt bei mehrmaliger Applikation des Vektors beobachtet werden [6-8, 46, 60, 62, 117, 121-124]. Deshalb werden zur

Zeit weitere Serotypen des Virus auf existierende Antikörper im Menschen untersucht, um den geeignetsten Vektor für die humane Anwendung zu finden.

Da der LDL-Rezeptor des Kaninchens erst kürzlich kloniert wurde, wurde in unseren Versuchen der zur Verfügung stehende humane LDL-R verwendet.

Neben der Etablierung der bereits in der Literatur beschriebenen Gentherapieversuche, war ein wesentliches Ziel dieser Arbeit eine Dosis-Wirkungs-Beziehung bei Verwendung unterschiedlicher Virusdosierungen zu dokumentieren und deren Effekt auf das Ausmaß der Cholesterinsenkung festzustellen. Auch sollte die Dauer der beobachteten Veränderungen aufgezeichnet werden. Um dies umzusetzen, entschieden wir uns für regelmäßige Bestimmungen der Cholesterinserumkonzentration und mehrfache LDL-Stoffwechselkinetiken mit radioaktiv markierten LDL sowie zu einer Dokumentation des Therapieerfolgs durch szintigraphische Darstellung der radioaktiv markierten LDL-Fraktion nach Injektion in die Kaninchen.

Für die stoffwechselkinetischen Untersuchungen des LDL-Metabolismus wurde der Radiotracer ^{125}I verwendet, da seine diesbezügliche Anwendung als bereits ausreichend etabliert gilt [87, 88, 90, 94].

Als Radionuklid für die LDL-Markierung im Rahmen der Scanuntersuchungen musste ein Tracer gewählt werden, der szintigraphisch auch noch nach Tagen detektierbar ist, da insbesondere bei Patienten mit FH die LDL-Partikel langsam katabolisiert werden, was szintigraphische Untersuchungen auch Tage nach Injektion der radiomarkierten LDL noch sinnvoll macht. Hierbei standen die Radionuklide ^{125}I , ^{131}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ sowie ^{111}In zur Auswahl. Unter dem Gesichtspunkt einer eventuellen späteren Anwendung im Menschen erschien ^{125}I hierbei aufgrund seiner langen Halbwertszeit von 60 Tagen ungeeignet, zudem kommt es auf Grund eines zu niedrigen energetischen Niveaus der abgestrahlten Photonen zu einer nur unzureichenden szintigraphischen Darstellung [71, 84]. ^{123}I und $^{99\text{m}}\text{Tc}$ hingegen erschienen auf Grund ihrer zu geringen Halbwertszeit nicht geeignet [71, 84, 88]. Wir wählten deshalb den Gammastrahler ^{111}In , welcher mit einer Halbwertszeit von 2,83 Tagen in etwa die Halbwertszeit eines LDL-Partikels im Menschen aufweist. Dass sich dieses Radionuklid gut zur LDL-Markierung mit nachfolgender szintigraphischer Detektion und Monitoring des LDL-Metabolismus eignet, war darüber hinaus bereits im Rahmen der Entwicklung des *in vivo*-Scanverfahrens aufgezeigt worden. [6].

Die bereits ausgeführten Ergebnisse der Arbeitsgruppen um Wilson et al. und Brown et al. konnten durch unsere Durchführung eines adenoviral vermittelten Gentransfers des LDL-R im Kaninchenmodell bestätigt werden, zusätzlich wurden dosisabhängige Auswirkungen

beobachtet. Es kam zu einem signifikanten Abfall der Serumcholesterinkonzentrationen, welcher um so stärker ausgeprägt war, je größer die applizierte Vektorendosis war. Während es bei der Applikation von 1/10 der Virusdosis ($0,23 \times 10^{12}$ pfu) lediglich zu einer geringen Senkung der Cholesterinwerte um 13-19% kam, konnte nach Verabreichung der einfachen Dosis ($2,35 \times 10^{12}$ pfu) ein Absinken um 74% und bei Gabe der doppelten Dosis ($4,7 \times 10^{12}$ pfu) sogar eine Reduktion bis auf 1/10 der Ausgangswerte beobachtet werden. Der dabei beobachtete maximale Rückgang war jeweils am 5.-7. Tag nach Gentransfer zu verzeichnen, danach kam es zu einem allmählichen Ansteigen der Cholesterinwerte, so dass innerhalb von 12-18 Tagen nach Vektorgabe bei allen Kaninchen unabhängig von der verabreichten Virusdosis eine Nivellierung des Effekts mit Wiedererreichen der Ausgangswerte eintrat. Der teilweise dramatische Abfall der Cholesterinwerte ist hierbei am ehesten auf die hepatische Expression des LDL-R zurückzuführen. Die FPLC-Analytik der Kaninchenserum ergab, dass die cholesterinreiche LDL-Fraktion auch bis zu vier Wochen nach Gentherapie noch erniedrigt war, begleitend konnte ab dem vierten Tag nach Gentransfer ein Anstieg der triglyzeridreichen VLDL-Fraktion aufgezeigt werden. Hiermit wird erstmalig gezeigt, dass die Leber die erhöhte Cholesterinzufuhr nach dem Gentransfer mit einer erhöhten VLDL-Synthese kompensiert, was wiederum die zwei Wochen post Gentransfer erhobenen Serumcholesterinkonzentrationen erklärt.

Auch bei den vorangehend näher ausgeführten *ex* und *in vivo*-Studien waren Cholesterinsenkungen mit einem Maximum wenige Tage nach Gentransfer und einer allmählichen Nivellierung des Effekts in der Folgezeit beschrieben worden, Li et al. hatten zusätzlich eine Erhöhung der HDL-Fraktion aufzeigen können [61]. Im analogen Mausmodell konnte ebenfalls eine Cholesterinsenkung erreicht werden, vergleichbare Effekte bezüglich des HDL-Cholesterins konnten jedoch nicht beobachtet werden [80]. Die Ursache für den Wiederanstieg der Cholesterinwerte wenige Tage nach Gentransfer sowie für den gleichzeitigen HDL-Anstieg konnte von Li et al. nicht geklärt werden. Allgemein liegt der relativ kurzen Wirkung eines adenoviral vermittelten Gentransfers die nicht stabile Transfektion der Hepatozyten zugrunde, da die transfizierte DNA nicht ins Wirtszellgenom integriert wird, sondern episomal verbleibt. Zusätzlich hatten Untersuchungen im Vorfeld dieser Arbeit gezeigt, dass neben anti-adenoviralen Antikörpern auch Antikörper gegen den humanen LDL-R nach Gentransfer limitierend wirken können [6].

Es wurden ergänzend *in vivo*-Stoffwechseluntersuchungen durchgeführt, um die durch den LDL-R-Gentransfer vermittelte gesteigerte hepatische Aufnahme Indium-markierter LDL und die Cholesterinsenkung durch gesteigerten Katabolismus als Folge einer erhöhten LDL-R-Aktivität

zu bestätigen. Stoffwechselkinetische Untersuchungen gelten als geeignetes Instrument, um den Metabolismus einer Substanz aufzuzeichnen. So gilt der verlangsamte Katabolismus der LDL-Fraktion als Zeichen einer gestörten LDL-Aufnahme in die Zelle und somit als Hinweis auf einen LDL-R- oder Apo B-Defekt. In den USA sind solche Untersuchungen mit radiomarkierten LDL auch am Menschen möglich, in Deutschland hingegen sind sie bislang nur im Tiermodell erlaubt.

Vorangehende Untersuchungen hatten bereits einen nahezu identischen Katabolismus von Human-LDL und Kaninchen-LDL aufzeigen können, nach Transfektion von Kaninchen mit dem humanen LDL-R kam es jedoch zu einem beschleunigten Abbau der humanen LDL gegenüber den Kaninchen-LDL. Dies sprach für einen spezifischen Aufnahme-prozeß des humanen LDL-R und belegte Expression und Funktionsfähigkeit des humanen LDL-R nach Gentransfer. Zusätzlich wurde sichergestellt, dass der verwendete Radiotracer keinen Einfluß auf den LDL-Metabolismus nahm [6]. In unseren Experimenten verwendeten wir für die Stoffwechselkinetiken vor und nach Gentherapie humane LDL, welche mit dem Iodisotop 125 markiert worden waren. Vor Gentherapie konnte für alle an der Untersuchung beteiligten Tiere eine nahezu identische Radioaktivitätsabklingkurve nachgewiesen werden, was für einen vergleichbaren LDL-Katabolismus sprach. Nach dem Gentransfer zeigte sich als Zeichen eines funktionell intakten transgen exprimierenden LDL-R bei allen Tieren eine erhöhte katabole Rate der injizierten radiomarkierten LDL. Dieser Effekt war auch nach 113 Tagen, also am Ende unseres Experimentes, noch nachweisbar, allerdings schien er von der gewählten Virusdosis unabhängig zu sein, da sich bei den mit höheren Virusmengen therapierten Tieren nicht zwangsläufig eine höhere katabole Rate der LDL aufzeigen ließ als bei den Kaninchen, welche nur eine vergleichsweise geringe Virusmenge erhielten.

Ähnliche Resultate lieferten die parallel durchgeführten *in vivo*-Scanuntersuchungen der Kaninchen. Diese basierten auf einem zuvor entwickelten wenig invasiven bildgebenden Verfahren, welches das Vorhandensein des LDL-R *in vivo* nachweisen kann und semiquantitative Aussagen über seine Aktivität ermöglicht. Prinzip dieses Verfahrens ist die Injektion von mit ^{111}In markierten LDL in den zu untersuchenden Organismus mit anschließender Darstellung der Aktivitätsverteilung via Gammakamera. Die vor Gentransfer angefertigten Aufnahmen der Kaninchen zeigten eine hauptsächliche Aktivitätsanreicherung über den gut durchbluteten Organen Herz, Leber, Lunge sowie in abgeschwächter Form über den großen Gefäßen. Im Zuge der LDL-Metabolisierung und der Freisetzung von freiem Indium stellten sich im weiteren Verlauf verstärkt die Nieren und die Blase dar. Nach Transfektion mit

dem LDL-Rezeptorgen konnte bereits eine Stunde nach Injektion der radiomarkierten LDL eine spezifische Anreicherung über der Leber nachgewiesen werden, die auf den prä-Aufnahmen gut sichtbare Herzregion trat hingegen in den Hintergrund. Dieser Effekt ließ sich zu allen Zeitpunkten nach Gentherapie aufzeigen, selbst nach 113 Tagen schienen die LDL noch selektiv in der Leber zu akkumulieren.

Um eine semiquantitative Auswertung zu gewährleisten, wurde anschließend das Leber/Herz-Verhältnis ermittelt. Das Prinzip hierbei besteht darin, die gemessene Radioaktivität über einem bestimmten Organ, in unserem Fall der Leber, zur gemessenen Aktivität über dem Herzen, als dem am stärksten durchbluteten Organ, in Beziehung zu setzen (Organ/Herz-Ratio). Je größer dieser Wert, desto stärker ist das entsprechende Organ mit ^{111}In angereichert. Während in unseren Experimenten vor Gentherapie das Leber/Herz-Verhältnis um einen Wert von ca. 1,5 schwankte, konnte bei mit dem LDL-R gentransfizierten Kaninchen eine Erhöhung um den Faktor 7,5 aufgezeigt werden, wobei das Maximum am 4. Tag nach Gentransfer zu dokumentieren war. Dies sprach für eine vermehrte ^{111}In -Akkumulation in der Leber als Ausdruck einer erfolgreichen LDL-R-Expressierung. Zwar ließ sich zu den folgenden Zeitpunkten ein allmähliches Absinken des L/H-Quotienten beobachten, trotzdem konnten zum letzten Untersuchungszeitpunkt nach 113 Tagen immer noch deutlich über den Vorgrößen liegende Zahlen nachgewiesen werden. Wie bei den Stoffwechselkinetiken ließ sich auch hierbei keine Korrelation zwischen verwendeter Virusmenge und Höhe der L/H-Ratio aufzeigen.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse unserer Versuche für einen erfolgreich durchgeführten Gentransfer des LDL-R im WHHL-Kaninchen, wobei festgestellt werden muß, dass die adenoviral vermittelte transgene Expression des LDL-R durch die Bestimmung des Serumcholesterins nicht korrekt wiedergegeben wird. Denn zum einen konnte bei der Bestimmung des Serumcholesterins ein dosisabhängiger Effekt beobachtet werden, d.h. je größer die verwendete Virusmenge im Rahmen des Gentransfers war, desto größer war auch das Ausmaß der passager beobachteten Gesamtcholesterinsenkung, dieser dosisabhängige Effekt zeigte sich bei den Stoffwechselkinetiken mit ^{125}I -LDL und bei den Scanuntersuchungen mit ^{111}In -LDL jedoch nicht. Darüber hinaus kam es innerhalb von 12-18 Tagen nach Gentransfer zu einem Wiedererreichen der Serumcholesterinausgangswerte, wohingegen die *in vivo*-Stoffwechselkinetiken eine erhöhte Abbaurrate radiomarkierter LDL über die gesamte Dauer des Experimentes von 120 Tagen belegten. Auch die szintigraphischen Untersuchungen konnten eine LDL-R-Expression über den untersuchten Zeitraum von 113 Tagen aufzeigen, wenngleich sie auch im Laufe der Zeit nachließ. Die FPLC-Analytik zeigte, dass die zwei Wochen nach

Gentransfer erhobenen Serumcholesterinkonzentrationen Folge einer erhöhten hepatischen VLDL-Synthese waren, was somit erstmalig demonstriert, dass die Leber hierdurch die post Gentransfer erhöhte Cholesterinzufuhr kompensiert.

Die allmähliche Nivellierung des Gentherapieeffekts ist bislang noch weitestgehend unklar. Sicher ist, dass beim adenoviral vermittelten Gentransfer durch ausbleibende Integration der rekombinanten DNA ins Wirtszellgenom eine stabile Transfektion unterbleibt. Zudem konnte in mehreren Studien eine Antikörperbildung gegen virale Proteine oder das Genprodukt nachgewiesen werden [6-8, 46, 60, 62, 117, 121- 124]. In den dieser Arbeit vorangegangenen Untersuchungen konnte ebenfalls eine Antikörperbildung gegen den humanen LDL-R aufgezeigt werden [6]. Es wurde gemutmaßt, dass durch die Antikörper der LDL-R möglicherweise blockiert wird, so dass er kein LDL internalisieren kann und damit inaktiv wird. Inwieweit die Antikörperbildung tatsächlich eine Rolle spielt, ist noch unklar. Erste Versuche, welche begleitend zum Gentransfer Immunsuppressiva einsetzten, zeigten hoffnungsvolle Ergebnisse, so dass dieser Gedanke weiter ausgebaut werden sollte [122, 124]. Auch der Einsatz eines Kaninchen-LDL-Rezeptors in vergleichbaren Versuchsaufbauten sollte diskutiert werden, um eine Immunantwort des Kaninchens gegen den humanen LDL-R auszuschließen. Hierdurch könnte möglicherweise eine signifikante Verlängerung des Gentherapieeffekts erzielt werden.

In unserem Versuch wurde auf histologische Untersuchungen von Lebergewebe gentransfizierter Kaninchen verzichtet, da in den vorangegangenen Versuchen zur Entwicklung eines *in vivo*-Scanverfahrens bereits mittels eines Immunfluoreszenzverfahrens die Expression des LDL-R auf parenchymalen Leberzellen nachgewiesen werden konnte und keine Änderung der Verfahrenstechnik des Gentransfers vorgenommen wurde.

In den westlichen Industriestaaten ist die altersbedingte Gefäßsklerose, insbesondere die Koronarsklerose, die führende Todesursache. Hierbei ist der kausale Zusammenhang zwischen Atherogenese und erhöhten Serumcholesterinwerten belegt, so dass der Behandlung der Hypercholesterinämie ein zentraler Stellenwert zukommt. Häufig liegt dabei ein LDL-R-Defekt ursächlich zugrunde, so dass aus präventivmedizinischer Sicht nicht nur die therapeutische Erhöhung der LDL-R-Aktivität wünschenswert ist, sondern auch die einfache Identifikation eines LDL-R-Defekts. Leider ist letzteres trotz verbesserter molekularbiologischer Methoden noch immer aufwendig und nicht immer erfolgsversprechend. Während die Identifikation homozygoter LDL-R-negativer Patienten meist schon klinisch möglich ist, ist der wesentlich häufiger auftretende heterozygote LDL-R-Defekt (Häufigkeit 1:500) weitaus schwieriger zu diagnostizieren. Da aber eine Hypercholesterinämie sowohl polygenetisch als auch

monogenetisch (LDL-R-Defekt, ApoB-Defekt) bedingt sein kann, ist eine präzise Identifizierung sowohl unter therapeutischen als auch prognostischen Gesichtspunkten wünschenswert. Allerdings liefert die Untersuchung an Hautfibroblasten heterozygoter LDL-R-Defekt-Träger oft schwierig zu interpretierende Ergebnisse. FACS-Untersuchungen konnten sich bis heute aus methodischen Gründen nicht in der routinemäßigen LDL-R-Aktivitätsdiagnostik bewähren, so dass ein praktikables Verfahren zur *in vivo*-LDL-R-Diagnostik etabliert werden musste. Das in den vorangegangenen Versuchen entwickelte *in vivo*-Scanverfahren zeigte diesbezüglich eine sehr hohe Sensitivität und konnte bereits relativ geringe LDL-R-Aktivitätszunahmen darstellen. Um eine sichere Anwendung am Menschen zu gewährleisten, war Ziel dieser Arbeit, Aussagen über die für eine Gentherapie optimale Virusmenge zu treffen und die Dauer des Therapieeffekts zu verfolgen. Da in den Stoffwechselkinetiken und Scanuntersuchungen keine dosisabhängige Wirkung bezüglich der verabreichten Virusmenge zu beobachten war, wären weitere Versuchsreihen mit weiter absteigenden Virusdosierungen sinnvoll, zumal sich niedrige Virusmengen als weniger immunogen erwiesen haben [124]. Auch wären Langzeitexperimente mit noch längerer Laufdauer interessant, evtl. auch im Vergleich zu den einen normalen LDL-R exprimierenden New Zealand White Kaninchen, um die Dauer des Therapieeffekts noch genauer zu evaluieren.

Langfristig ist damit zu rechnen, dass die somatische Gentherapie Einzug in die routinemäßige Therapie homozygoter LDL-R-negativer Patienten halten wird. Die Tatsache, dass in tierexperimentellen Studien mit der Rekonstitution der LDL-Rezeptoraktivität von 0% auf nur 2-4% eine signifikante Serumcholesterinsenkung zu erreichen war, gibt Hoffnung zu der Annahme, dass auch beim Menschen die Herstellung einer residualen LDL-Rezeptoraktivität bereits zu einer deutlichen Verbesserung des klinischen Verlaufs führen kann. Dies wird zudem durch die klinische Beobachtung untermauert, dass rezeptornegative homozygote FH-Patienten einen wesentlich schwereren Krankheitsverlauf aufweisen als Homozygote mit einer Rezeptordefizienz, aber erhaltener Restfunktion [51, 52, 120]. Aber auch heterozygote FH-Patienten könnten zukünftig von gentherapeutischen Maßnahmen profitieren. Sicherlich ist die medikamentöse Cholesterinsenkung neben der cholesterinarmen Diät und der körperlichen Aktivitätssteigerung unumstritten effektiv und relativ nebenwirkungsarm, doch für Patienten bei denen mit diesen Maßnahmen keine ausreichende Cholesterinsenkung zu erreichen ist, eröffnet die somatische Gentherapie neue Behandlungsalternativen. Bei homozygot Erkrankten könnten damit gar die bislang im Kindesalter durchgeführten Lipidapheresen oder die Lebertransplantation umgangen werden. Prämisse hierfür sind allerdings permanent

exprimierende, nebenwirkungsarme Vektoren, was durch die heutzutage verwendeten Vektoren noch nicht gewährleistet werden kann [123].

Dass die ^{111}In -LDL-Szintigraphie geeignet ist, den Erfolg einer LDL-R-Gentherapie im Tiermodell der FH zu verfolgen, konnte bereits dokumentiert werden [6]. Zudem scheinen auf Grund der bereits 4 Stunden post injectionem beobachteten hohen hepatischen LDL-Aufnahme künftig auch $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Markierungen (Gammakamera) oder F-18-Markierungen (PET, MicroPET) möglich, um die Durchführung am Menschen weiter zu vereinfachen. Die Übertragung unserer Ergebnisse vom Tiermodell auf die Anwendung im Menschen erscheint realisierbar, vorher wäre jedoch eine Optimierung der vorangehend diskutierten Probleme wünschenswert.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die autosomal-dominant vererbte Familiäre Hypercholesterinämie (FH) gehört zu den häufigsten monogenetischen Stoffwechselerkrankungen und ist durch eine Erhöhung des Gesamt- und LDL-Cholesterins, eine Xanthomatose der Sehnen und der Haut sowie durch eine frühzeitig einsetzende Atherosklerose, insbesondere eine prämatüre Koronarsklerose, gekennzeichnet. Ursächlich liegt der Erkrankung eine Defizienz des LDL-Rezeptors zugrunde, welcher beim Gesunden zu 70-80% in der Leber vorkommt. Diesem Organ kommt damit kausal und therapeutisch eine zentrale Bedeutung zu, weshalb sich die FH hervorragend als Modellkrankheit im Rahmen Leber-gezielter gentherapeutischer Bemühungen eignet.

Um den LDL-R-Gentransfer wenig invasiv verfolgen zu können, war dieser Arbeit die Entwicklung eines externen *in vivo*-Scanverfahrens vorausgegangen, welches den erfolgreichen Gentransfer darstellen kann und eine semiquantitative Auswertung ermöglicht. Wir untersuchten nun den Einfluß einer Virusdosiseskulation auf Cholesterinsenkung und Langzeitexpression im adenoviral vermittelten LDL-R-Gentransferexperiment im Kaninchenmodell. Als Vektor im Rahmen der Gentherapie diente hierbei ein Adenovirus mit einkloniertem humanem CMV-Promotor und dem humanen LDL-Rezeptor, welcher den Tieren in unterschiedlichen Dosierungen verabreicht wurde. Vor und nach Gentransfer wurden mit ¹¹¹In radiomarkierte humane LDL in Kaninchen mit einem kongenitalen LDL-R-Defekt (Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbits) injiziert. Anschließend wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Scanuntersuchungen durchgeführt, welche bei allen Tieren eine Aufnahme der humanen LDL via dem humanen LDL-R aufzeigen konnten. Die erfolgreiche Durchführung des Gentransfers wurde zudem durch die Bestimmung der Serumcholesterinkonzentration sowie durch *in vivo*-Stoffwechselkinetiken radioiodierter LDL vor und nach Gentherapie bestätigt. Da im Rahmen der vorangegangenen Experimente ergänzende histochemische Untersuchungen die Präsenz des LDL-R in der Leber hatten aufzeigen können, wurde im Rahmen unserer Versuche darauf verzichtet. Während die Bestimmung der Serumcholesterinkonzentration eine eindeutige Abhängigkeit von der Menge der verwendeten Vektordosis zeigte, ließ sich dieser Effekt im Rahmen der LDL-Stoffwechselkinetiken und der semiquantitativen Auswertung der Scanuntersuchungen nicht nachvollziehen. Es ließ sich zudem in der FPLC-Analytik erstmalig nachweisen, dass die Leber die erhöhte Cholesterinzufuhr nach Gentransfer mit einer vermehrten VLDL-Synthese kompensiert, was die wieder normalisierten Serumcholesterinkonzentrationen zwei Wochen nach Gentransfer erklärt. Die adenoviral vermittelte transgene Expression des LDL-R wird also durch die Bestimmung des Serumcholesterins nicht korrekt wiedergegeben,

zumal die Stoffwechselkinetiken eine erhöhte LDL-Abbaurate und die szintigraphischen Untersuchungen eine LDL-R-Expression über die gesamte Dauer des 4-monatigen Experiments zeigen konnten.

Insgesamt erscheint der Einsatz eines ähnlichen Gentherapieprotokolls am Menschen möglich. Vorher sollten jedoch Versuche mit niedrigeren Vektordosierungen durchgeführt werden, um sich an den minimal nötigen Bedarf zur Durchführung des Gentransfers heranzutasten. Das *in vivo*-Scanverfahren scheint bezüglich der verwendeten Radioaktivität und des Tracers auch beim Menschen einsetzbar. Da jedoch aufgrund des hohen Leber-Uptakes der LDL 4 Stunden p.i. dieser Zeitpunkt als günstigster Untersuchungszeitpunkt angesehen werden muß, wären damit künftig auch Markierungen mit anderen Nukliden, z.B. ^{99m}Tc -Markierungen (Gammakamera) oder F-18-Markierungen (PET, MicroPET) möglich. Insbesondere durch die Anwendung des PET-Verfahrens könnte die Empfindlichkeit noch gesteigert werden, was den baldigen Einsatz ähnlicher Gentherapieprotokolle am Menschen wahrscheinlicher macht.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACAT	Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase
Ad-CMV- β -Gal	Adenovirus mit dem β -Galactosidase-Gen und einkloniertem CMV-Promotor
Ad-CMV-hLDL-R	Adenovirus mit dem humanen LDL-Rezeptor-Gen und einkloniertem CMV-Promotor
ADP	Adenosindiphosphat
ApoA	Apolipoprotein A
ApoB	Apolipoprotein B
ApoC	Apolipoprotein C
ApoD	Apolipoprotein D
ApoE	Apolipoprotein E
ApoF	Apolipoprotein F
ApoG	Apolipoprotein G
ATP	Adenosintriphosphat
B/E-Rezeptor	Low Density Lipoprotein-Rezeptor
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	coding Desoxyribonucleid Acid
CETP	Cholesterinester-Transfer-Protein
CM	Chylomikronen
CM-R	Chylomikronen-Remnants
CMV	Cytomegalievirus
CURL	Compartment of Uncoupling of Receptor and Ligand
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleid Acid
DTPA	Diethylene Triamine Pentaacetic Acid

EDTA	E thylendi a mintetra a ccetat
EGF	E pidermal G rowth F actor
FACS	F luorescence- A ctivated C ell S orter
FH	F amiliäre H ypercholesterinämie
FKS	F ötales K älberserum
FPLC	F ast P rotein L iquid C hromatography
GK	G lycer k inase
GPO	G lycerin p hos h ato x idase
HDL	H igh D ensity L ipoprotein
HELP	H eparin-mediated E xtracorporeal L DL P recepitation
HIV	H uman I mmunodeficiency V irus
hLDL-R	h umaner L ow D ensity L ipoprotein- R ezeptor
HMG-CoA	3-H ydroxy- 3-M ethyl- G lutaryl- C oenzym A
HTGL	H epatische T riglyzerid- L ipase
IDL	I ntermediate D ensity L ipoprotein
ITR	I nverted T erminal R epet
L/H-Ratio	L eber/ H erz- R atio
LCAT	L ecithin- C holesterol- A cyl- T ransferase
LDL	L ow D ensity L ipoprotein
LDL-R	L ow D ensity L ipoprotein- R ezeptor
LPL	L ipoprotein i lipase
LRP	L DL- R eceptor R elated P rotein
MOI	M ultiplicity O f I nfection
mRNA	m essenger R NA
NLP	N ormolipämischer P atient
p.i.	p ost i njectionem

PBS	Phosphat Buffered Saline
PEG	Polyethylenglycol
PET	Positronenemissionstomographie
pfu	plaque forming units
RNA	Ribonucleid Acid
ROI	Region of Interest
rpm	rounds per minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
t 1/2	Halbwertszeit
TG	Triglyzeride
USA	United States of America
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
WHHL-Kaninchen	Watanabe Heritable Hyperlipidemic- Kaninchen

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Karlson, P., Doenecke, D., Koolman, J. *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 14. Aufl. Thieme, Stuttgart, New York, 1994, 103-164
2. Morgan, R. A., Anderson, W. F. *Human Gene Therapy*. Annu Rev Biochem, 1993, 62:191-217
3. Grabowski, G. A., Whitsett, J. A. *Gene Therapy*. In: Nelson, W. E., Behrmann, R. E., Kliegman, R. M., Arvin, A. M., Nelson Textbook of Pediatrics. W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1996, 321-326
4. Vesting, J.-W. *Legal Aspects of Genetic Therapies in Germany*. In: Müller, S., Simon, J. W., Vesting, J.-W., Interdisciplinary approaches to gene therapy: legal, ethical and scientific aspects. Springer-Verlag, 1997, 91-97
5. Tzeng, E., Shears, L., Lotze, M., Billiar, T. *Gene Therapy*. In: Tzeng, E., Shears, L., Lotze, M., Billiar, T. Current Problems in Surgery. Mosby-Year Book, St. Louis, December 1996, 963-1041
6. Büttner, C. A. *Entwicklung eines in vivo Scan-Verfahrens zur Detektion des LDL-Rezeptor Gentransfers im Kaninchenmodell*. Hannover, Med. Hochsch., Abtlg. für Gastroenterologie und Hepatologie, Diss., 1999
7. Sakata, H., Taketazu, G., Nagaya, K., Shirai, M., Sugai, R., Ikegami, K., Maruyama, S. *Outbreak of severe infection due to adenovirus type 7 in a paediatric ward in Japan*. In: J Hosp Infect, 1998, 39: 207-211
8. Abzug, M. J., Levin, M. J. *Neonatal Adenovirus Infection: Four Patients and Review of the Literature*. In: Pediatrics, 1991, 87: 890-896
9. Lynch, C. M., Hara, P. S., Leonard, J. C., Williams, J. K., Dean, R. H., Geary, R. L. *Adeno-Associated Virus Vectors for Vascular Gene Delivery*. In: Circ Res, 1997; 80: 497-505
10. Löffler, G., Petrides, P. E. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Verlag, 1997, 350-354, 463-480

11. Dargel, R. *Biochemie und Pathobiochemie der Lipoproteine: Lipoproteine und Atherosklerose*. Akademie-Verlag, Berlin, 1991, 1-71
12. Havel, R. J., Goldstein, J. L., Brown, M. S. *Lipoproteins and Lipid Transport*. In Bondy, P. K., Rosenberg, L. E. *Metabolic Control and Disease*, Saunders Company, Philadelphia, 1980, 393-433
13. Schwandt, P., Richter, W. O. *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*. Schattauer-Verlag, Stuttgart, New York, 1995, Seite 1-33, 41-47, 145-158
14. Darnell, J. E., Lodish, H., Baltimore, D. *Transport durch Zellmembranen*. In: Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D. *Molekulare Zellbiologie*. Walter de Gruyter & Co-Verlag, Berlin, New York, 1993, 650-661
15. Stryer, L. *Biosynthese der Bausteine*. In: Biochemie. Spektrum-Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996, 733-744
16. Schmidt, H., Kostner, G. M. *Hypercholesterinämien*. In: Wien Med Wochenschr, Themenheft Hypercholesterinämie, Heft 12/13, 1994, 312-319
17. Südhof, T. C., Goldstein, J. L., Brown, M. S., Russell, D. W. *The LDL receptor gene: A mosaic of exons shared with different proteins*. In: Science, 1985; 228: 815-822
18. Hobbs, H. H., Russell, D. W., Brown, M. S., Goldstein, J. L. *The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein*. In: Annu Rev Genet, 1990; 24: 133-170
19. Hobbs, H. H., Brown, M. S., Goldstein, J. L. *Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia*. In: Hum Mutat, 1992; 1: 445-466
20. Reshef, A., Nissen, H., Triger, L., Hensen, T. S., Eliav, O., Schurr, D., Safadi, R., Gare, M., Leitersdorf, E. *Molecular genetics of familial hypercholesterolemia in Israel*. In: Hum Genet, 1996; 98: 581-586
21. Schmidt, H. H.-J., Hill, S., Makariou, E. V., Feuerstein, I. M., Dugi, K. A., Hoeg, J. M. *Relation of Cholesterol-Year Score to Severity of Calcific Atherosclerosis and Tissue Deposition in Homozygous Familial Hypercholesterolemia*. In: Am J Cardiol, 1996;

22. Goldstein, J. L., Hobbs, H. H., Brown, M. S., Havel, R. J., Kane, J. P. *Lipoprotein and lipid metabolism disorders*. In: Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B., Fredrickson, D. S. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 7/e, Mc Graw Hill, 1995, 1840-1885, 1981-2030
23. Goldstein, J. L., Brown, M. S. *Atherosclerosis: The low-density lipoprotein receptor hypothesis*. In: *Metabolism*, 1977; 26: 1257
24. Rose, V., Wilson, G., Steiner, G. *Familial hypercholesterolemia: Report of coronary death at age 3 in a homozygous child and prenatal diagnosis in a heterozygous sibling*. In: *J Pediatr*, 1982; 100: 757
25. Hobbs, H. H., Brown, M. S., Russell, D. W., Davignon, J., Goldstein, J. L. *Deletion in the gene for the LDL receptor in majority of French Canadians with familial hypercholesterolemia*. In: *N Engl J Med*, 1987; 317: 734
26. Gagné, C., Moorjani, S., Brun, D., Toussaint, M., Lupien, P.-J. *Heterozygous familial hypercholesterolemia: Relationship between plasma lipids, lipoproteins, clinical manifestations and ischaemic heart disease in men and women*. In: *Atherosclerosis*, 1979; 34: 13-24
27. Kwiterovich, P. O., Fredrickson, D. S., Levy, R. I. *Familial Hypercholesterolemia (One Form of Familial Type II Hyperlipoproteinemia)*. In: *J Clin Invest*, 1974; 53: 1237-1249
28. Hoeg, J. M., Demosky, S. J., Schaefer, E. J., Starzl, T. E., Brewer, H. B. *Characterization of Hepatic Low Density Lipoprotein Binding and Cholesterol Metabolism in Normal and Homozygous Familial Hypercholesterolemic Subjects*. In: *J Clin Invest*, 1984; 73: 429-436
29. Hoeg, J. M., Edge, S. B., Demosky, S. J., Starzl, T. E., Triche, T., Gregg, R. E., Brewer, H. B. *Metabolism of low-density lipoproteins by cultured hepatocytes from normal and homozygous familial hypercholesterolemic subjects*. In: *Biochim Biophys Acta*, 1986; 876: 646-657

30. Top, B., Uitterlinden, A. G., Van der Zee, A., Kastelein, J. J. P., Gevers Leuven, J. A., Havekes, L. M., Frants, R. R. *Absence of mutations in the promoter region of the low density lipoprotein receptor gene in a large number of familial hypercholesterolemia patients as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis.* In: Hum Genet, 1992; 89: 561-565
31. Edge, S. E., Hoeg, J. M., Triche, T., Schneider, P. D., Brewer, H. B. *Cultured human hepatocytes. Evidence for metabolism of low density lipoproteins by a pathway independent of the classical low density lipoprotein receptor.* In: J Biol Chem, 1986; 261: 3800-3806
32. Strachan, T., Read, A. P. *Molekulare Humangenetik.* Spektrum-Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996, 661-704
33. Fan, J., Watanabe, T. *Cholesterol-fed and transgenic rabbit models for the study of atherosclerosis.* In: J Atheroscler Thromb 2000; 7(1): 26-32
34. Buja, L. M., Clubb, F. J., Bilheimer, D. W., Willerson, J. T. *Pathobiology of human familial hypercholesterolemia and a related animal model, the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit.* In: Eur Heart J, 1990, Aug 11; Suppl. E: 41-52
35. Carranza-Bencano, A., Fernández-Centeno, M., Leal-Cerro, A., Duque-Jimeno, V., Gornes-Arroyo, J. A., Zurita-Gutierrez, M. *Xanthomas of the achilles tendon: report of a bilateral case and review of the literature.* In: Foot Ankle Int, 1999 May; 20(5): 314-16
36. Stefanutti, C., Lucani, G., Vivenzio, A., Di Giacomo, S. *Diet only and diet plus simvastatin in the treatment of heterozygous familial hypercholesterolemia in childhood.* In: Drugs Exp Clin Res, 1999; 25(1): 23-28
37. Schwandt, P., Richter, W. O. *Medikamentöse Therapie der Hypercholesterinämie.* In: Wien Klin Wochenschr, 1995; 107(18): 544-8
38. Connor, W. E., Connor, S. L. *Dietary treatment of familial hypercholesterolemia.* In: Arteriosclerosis, 1989 Jan-Feb; 9(1): I91-I105
39. Illingworth, D. R., Bacon, S. *Treatment of heterozygous familial hypercholesterolemia*

- with lipid-lowering drugs.* In: Arteriosclerosis, 1989 Jan-Feb; 9(1): I121-I134
40. Kajinami, K., Mabuchi, H. *Therapeutic effects of LDL apheresis in the prevention of atherosclerosis.* In: Curr Opin Lipidol, 1999 Okt; 10(5): 401-6
 41. Thompson, G. R., Barbir, M., Okabayashi, K., Trayner, I., Larkin, S. *Plasmapheresis in familial hypercholesterolemia.* In: Arteriosclerosis, 1989 Jan-Feb; 9(1): I152-I157
 42. Bilheimer, D. W. *Portacaval shunt and liver transplantation in treatment of familial hypercholesterolemia.* In: Arteriosclerosis, 1989 Jan-Feb; 9(1): I158-I163
 43. Starzl, T. E., Bahnson, H. T., Hardesty, R. L., Iwatsuki, S., Gartner jr., J. C., Bilheimer, D. W., Shaw jr., B. W., Griffith, B. P., Zitelli, B. J., Malatack, J. J., Urbach, A. H. *Heart-liver transplantation in a patient with familial hypercholesterolemia.* In: Lancet, 1984; 1: 1382-1383
 44. Offstad, J., Schrumpf, E., Geiran, O., Søreide, O., Simonsen, S. *Plasma exchange and heart-liver transplantation in a patient with homozygous familial hypercholesterolemia.* In: Clin Transplant, 2001; 15(6): 432-436
 45. Culver, K. W. *The potential for genetic healing.* In: JAMA, 1992; 268(13): 1768
 46. Rüger, R. *Leberzell-Gentherapie – Perspektiven nach einem heroischen Start.* In: Fortschr Med, 1995; 24: 341/25
 47. Raper, S. E. *Hepatocyte transplantation and gene therapy.* In: Clin Transplant, 1995; 9(3 Pt 2): 249-54
 48. Wilson, J. M., Johnston, D. E., Jefferson, D. M., Mulligan, R. C. *Correction of the genetic defect in hepatocytes from the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit.* In: Proc Natl Acad Sci USA, 1988; 85: 4421-4425
 49. Wilson, J. M., Johnston, D. E., Jefferson, D. M., Mulligan, R. C. *Correction of metabolic defect by gene transfer into isolated hepatocytes.* In: J Gastroenterol Hepatol, 1989; 4: 585-587
 50. Wilson, J. M., Chowdhury, N. R., Grossman, M., Wajsman, R., Epstein, A., Mulligan, R. C., Chowdhury, J. R. *Temporary amelioration of hyperlipidemia in low density*

- lipoprotein receptor-deficient rabbits transplanted with genetically modified hepatocytes*. In: Proc Natl Acad Sci USA, 1990; 87: 8437-8441
51. Chowdhury, J. R., Grossman, M., Gupta, S., Chowdhury, N. R., Baker jr., J. R., Wilson, J. M. *Long-term improvement of hypercholesterolemia after ex vivo gene therapy in LDLR-deficient rabbits*. In: Science, 1991; 254: 1802-1805
 52. Grossman, M., Rader, D. J., Muller, D. W. M., Kolansky, D. M., Kozarsky, K., Clark III, B. J., Stein, E. A., Lupien, P. J., Brewer jr., H. B., Raper, S. E., Wilson, J. M. *A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolemia*. In: Nat Med, 1995; 1(11): 1148-1154
 53. Watanabe, Y. *Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit); incidence and development of atherosclerosis and xanthoma*. In: Atherosclerosis, 1980; 36: 261-268
 54. Havel, R. J., Yamada, N., Shames, D. M. *Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit: animal model for familial hypercholesterolemia*. In: Arteriosclerosis, 1989 Jan-Feb; 9(1): I33-I38
 55. Buja, L. M., Kita, T., Goldstein, J. L., Watanabe, Y., Brown, M. S. *Cellular pathology of progressive atherosclerosis in the WHHL rabbit: an animal model of familial hypercholesterolemia*. In: Arteriosclerosis, 1983 Jan-Feb; 3(1): 87-101
 56. Havel, R. J., Kita, T., Kotite, L., Kane, J. P., Hamilton, R. L., Goldstein, J. L., Brown, M. S. *Concentration and composition of lipoproteins in blood plasma of the WHHL rabbit*. In: Arteriosclerosis, 1982 Nov-Dec; 2(6): 467-474
 57. Kita, T., Brown, M. S., Watanabe, Y., Goldstein, J. L. *Deficiency of low density lipoprotein receptors in liver and adrenal gland of the WHHL rabbit, an animal model of familial hypercholesterolemia*. In: Proc Natl Acad Sci USA, 1981; 78(4): 2268-2272
 58. Dichek, D. A., Bratthauer, G. L., Beg, Z. H., Anderson, K. D., Newman, K. D., Zwiebel, J. A., Hoeg, J. M., Anderson, W. F. *Retroviral vector-mediated in vivo expression of low-density-lipoprotein receptors in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit*. In: Somat Cell Mol Genet, 1991; 17(3): 287-301

59. Wilson, J. M., Grossman, M., Wu, C. H., Chowdhury, N. R., Wu, G. Y., Chowdhury, J. R. *Hepatocyte-directed gene transfer in vivo leads to transient improvement of hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor-deficient rabbits.* In: J Biol Chem, 1992; 267(2): 963-967
60. Kozarsky, K. F., McKinley, D. R., Austin, L. L., Raper, S. E., Stratford-Perricaudet, L. D., Wilson, J. M. *In vivo correction of low density lipoprotein receptor deficiency in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit with recombinant adenoviruses.* In: J Biol Chem; 1994; 269(18): 13695-13702
61. Li, J., Fang, B., Eisensmith, R. C., Li, X. H. C., Nasonkin, I., Lin-Lee, Y.-C., Mims, M. P., Hughes, A., Montgomery, C. D., Roberts, J. D., Parker, T. S., Levine, D. M., Woo, S. L. C. *In vivo gene therapy for hyperlipidemia: phenotypic correction in Watanabe rabbits by hepatic delivery of the rabbit LDL receptor gene.* In: J Clin Invest, 1995; 95: 768-773
62. Brown, D. R., Brousseau, M. E., Shamburek, R. D., Talley, G. D., Meyn, S., Demosky jr., S. J., Santamarina-Fojo, S., Brewer jr., H. B., Hoeg, J. M. *Adenoviral delivery of low-density lipoprotein receptors to hyperlipidemic rabbits: receptor expression modulates high-density lipoproteins.* In: Metabolism, 1996; 45(12): 1447-1457
63. Herz, J., Gerard, R. D. *Adenovirus-mediated transfer of low density lipoprotein receptor gene acutely accelerates cholesterol clearance in normal mice.* In: Proc Natl Acad Sci USA, 1993; 90: 2812-2816
64. Yamamoto, T., Davis, C. G., Brown, M. S., Schneider, W. J., Casey, M. L., Goldstein, J. L., Russell, D. W. *The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA.* In: Cell, 1984; 39(1): 27-38
65. Brewer, H. B., Ronan, R., Meng, M., Bishop, C. *Isolation and characterization of apolipoproteins A-I, A-II, and A-IV.* Methods Enzymol, 1986; 128: 223-246
66. Mac Farlane, A. S. *Efficient trace-labeling of proteins with iodine.* In: Nature, 1958; 182: 53-55
67. Langer, T., Strober, W., Levy, R. I. *The metabolism of low density lipoproteins in*

- familial type II hyperlipoproteinemia*. In: J Clin Invest, 1972; 51: 1528-1536
68. Lees, R. S., Lees, A. M., Strauss, H. W. *External imaging of human atherosclerosis*. J Nucl Med, 1983; 24: 154-156
 69. Hoffmann, P., Lieser, K. H. *Methoden der Kern- und Radiochemie*. 1991, Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft
 70. Gansow, O. A. *Newer approaches to the radiolabeling of monoclonal antibodies by use of metal chelates*. In: Nucl Med Biol, 1991; 18(4): 369-381
 71. Rosen, J. M., Butler, S. P., Meinken, G. E., Wang, T. S. T., Ramakrishnan, R., Srivastava, S. C., Alderson, P. O., Ginsberg, H. N. *Indium-111-labeled LDL: a potential agent imaging atherosclerotic disease and lipoprotein distribution*. In: J Nucl Med, 1990; 31: 343-350
 72. Virgolini, I., Angelberger, P., Li, S. R., Koller, F., Koller, E., Pidlich, J., Lupattelli, G., Sinzinger, H. *Indium-111-labeled low-density lipoprotein binds with higher affinity to the human liver as compared to iodine-123-low-density-labeled lipoprotein*. In: J Nucl Med, 1991; 32: 2132-2138
 73. Hnatowich, D. J., McGann, J. *DTPA-coupled proteins – procedures and precautions*. In: Int J Rad Appl Instrum, Part B, 1987; 14(6): 563-568
 74. Hnatowich, D. J. *Label stability in serum of four radionuclides on DTPA-coupled antibodies – an evaluation*. In: Int J Rad Appl Instrum, Part B, 1986; 13(4): 353-358
 75. Najafi, A., Childs, R. L., Hnatowich, D. J. *Coupling antibody with DTPA – an alternative to the cyclic anhydride*. In: Int J Appl Rad Isotopes, 1984; 35(6): 554-557
 76. Hnatowich, D. J., Childs, R. L., Lanteigne, D., Najafi, A. *The preparation of DTPA-coupled antibodies radiolabeled with metallic radionuclides: an improved method*. In: J Immunol Methods, 1983; 65(1-2): 147-157
 77. Hnatowich, D. J., Layne, W. W., Childs, R. L., Lanteigne, D., Davis, M. A., Griffin, T. W., Doherty, P. W. *Radioactive labeling of antibody: a simple and efficient method*. In: Science, 1983; 220(4597): 613-615

78. Markwell, A. K., Haas, S. M., Biebler, L. L., Tolbert, N. E. *A modification of the lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples.* In: Anal Biochem, 1978; 87: 206-210
79. Kobayashi, K., Oka, K., Forte, T., Ishida, B., Teng, B., Ishimura-Oka, K., Nakamuta, M., Chan, L. *Reversal of hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice by adenovirus-mediated gene transfer of the very low density lipoprotein receptor.* In: J Biol Chem, 1996; 271(12): 6852-6860
80. Ishibashi, S., Brown, M. S., Goldstein, J. L., Gerard, R. D., Hammer, R. E., Herz, J. *Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery.* In: J Clin Invest, 1993; 92: 883-893
81. Kozarsky, K. F., Jooss, K., Donahee, M., Strauss III, J. F., Wilson, J. M. *Effective treatment of familial hypercholesterolaemia in the mouse model using adenovirus-mediated transfer of the VLDL receptor gene.* In: Nat Genet, 1996; 13: 54-62
82. Lupattelli, G., Virgolini, I., Li, S. R., Sinzinger, H. *Low density lipoprotein receptors: preliminary results on „in vivo“ study.* In: Wien Klin Wochenschr, 1991; 103(15): 462-465
83. Banyai, M., Lupattelli, G., Li, S. R., Pongratz, S., Yang, Q., Böck, P., Angelberger, P., Virgolini, I. *Comparison of iodine-123 low-density lipoprotein (LDL) and indium-111 LDL binding to mononuclear cells of healthy normolipemic controls and patients with heterozygous familial hypercholesterolemia.* In: Eur J Nucl Med, 1994; 21(7): 634-639
84. Leitha, T., Hermann, M., Hüttinger, M., Angelberger, P., Dudczak, R. *Technetium-99m labelled LDL as a tracer for quantitative LDL scintigraphy. I. Tracer purification, in vitro and in vivo long-term stability, in vitro validation and biodistribution.* In: Eur J Nucl Med, 1993; 20(8): 667-673
85. Leitha, T., Staudenherz, A., Gmeiner, B., Hermann, M., Hüttinger, M., Dudczak, R. *Technetium-99m labelled LDL as a tracer for quantitative LDL scintigraphy. II. In vivo validation, LDL receptor-dependent and unspecific hepatic uptake and scintigraphic results.* In: Eur J Nucl Med, 1993; 20(8): 674-679

86. Leitha, T., Staudenherz, A., Hermann, M., Hüttinger, M., Gmeiner, B. *Parenchymal and nonparenchymal uptake of technetium-99m, indium-111, and iodine-125 low-density lipoprotein in the normal and estradiol-stimulated rat liver: tracer validation for quantitative low-density lipoprotein scintigraphy.* In: Hepatology, 1995; 22: 1289-1295
87. Virgolini, I., Angelberger, P., O'Grady, J., Sinzinger, H. *Low density lipoprotein labelling characterizes experimentally induced atherosclerotic lesions in rabbits in vivo as to presence of foam cells and endothelial coverage.* In: Eur J Nucl Med, 1991; 18: 944-947
88. Virgolini, I., Rauscha, F., Lupattelli, G., Angelberger, P., Ventura, A., O'Grady, J., Sinzinger, H. *Autologous low-density lipoprotein labelling allows characterization of human atherosclerotic lesions in vivo as to presence of foam cells and endothelial coverage.* In: Eur J Nucl Med, 1991; 18: 948-951
89. Hüttinger, M., Corbett, J. R., Schneider, W. J., Willerson, J. T., Brown, M. S., Goldstein, J. L. *Imaging of hepatic low density lipoprotein receptors by radionuclide scintiscanning in vivo.* In: Proc Natl Acad Sci USA, 1984; 81(23): 7599-7603
90. Chang, M. Y., Lees, A. M., Lees, R. S. *Low-density lipoprotein modification and arterial wall accumulation in a rabbit model of atherosclerosis.* In: Biochemistry, 1993; 32: 8518-8524
91. Lorberboym, M., Vallabhajosula, S., Lipszyc, H., Pastores, G. *Scintigraphic evaluation of Tc-99m-low-density lipoprotein (LDL) distribution in patients with Gaucher disease.* In: Clin Genet, 1997; 52(1): 7-11
92. Virgolini, I., Angelberger, P., Lupattelli, G., Li, S. R., Pidlich, J., Molinari, E., Sinzinger, H. *Comparison of different methods for LDL isolation and radioiodination on liver LDL receptor binding in vitro.* In: Int J Rad Appl Intrum, Part B, 1991; 18(5): 513-517
93. Billington, D., Jayson, G. G., Maltby, P. J. *Radioisotopes.* Introduction to Biotechniques, ed. Graham, J. M., and Billington, D. 1992, Oxford: Bios Scientific Publishers: 143-144

94. Vasile, E., Antohe, F. *An ultrastructural study of β -very low density lipoprotein uptake and transport by valvular endothelium of hyperlipidemic rabbits.* In: J Submicrosc Cytol Pathol, 1991; 23(2): 279-287
95. Patsch, W., Gotto, A. M., jr., Alaupovic, P. *Characterization of Plasma Lipoproteins.* In: Methods Enzymol, 1996; 263: 3-60
96. Mahley, R. W., Hui, D. Y., Innerarity, T. L., Beisiegel, U. *Chylomicron Remnant Metabolism: Role of Hepatic Lipoprotein Receptors in Mediating Uptake.* In: Arteriosclerosis, 1989 Jan-Feb; Supplement I (9): I14-I18
97. Dominiczak, M. H. *Lipid metabolism.* In: Curr Opin Lipidol, 1996; 7: U85-U91
98. Goldstein, J. L., Anderson, R. G. W., Brown, M. S. *Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis.* In: Nature, 1979; 279: 679-685
99. Basu, S. K., Goldstein, J. L., Brown, M. S. *Characterization of the Low Density Lipoprotein Receptor in Membranes Prepared from Human Fibroblasts.* In: J Biol Chem, 1978; 253 (11): 3852-3856
100. Brown, M. S., Goldstein, J. L. *Lipoprotein Receptors in the Liver: Control Signals for Plasma Cholesterol Traffic.* In: J Clin Invest, 1983; 72: 743-747
101. Jackson, R. L., Morrisett, J. D., Gotto, A. M., Jr. *The Mechanism of Lipid Binding by Plasma Lipoproteins.* In: Mol Cell Biochem, 1975; 6(1): 43-49
102. Schaefer, E. J., Eisenberg, S., Levy, R. I. *Lipoprotein apoprotein metabolism.* In: J Lipid Res, 1978; 19:667-682
103. Schmidt, H. H.-J., Tietge, U. J. F., Manns, M. P. *Perspectives of Liver Cell Transplantation: A Review.* In: Hepatogastroenterology, 1997; 44: 1013-1018
104. Hoeg, J., Starzl, T., Brewer H. J. *Liver transplantation for treatment of cardiovascular disease: Comparison with medication and plasma exchange in homozygous familial hypercholesterolemia.* In: Am J Cardiol, 1987; 59: 705-707
105. Bilheimer, D., Goldstein, J., Grundy, S., Starzl, T., Brown, M. *Liver transplantation to provide low-density-lipoprotein receptors and lower plasma cholesterol in a child with*

- homozygous familial hypercholesterolemia*. In: N Engl J Med, 1984; 311: 1658-1664
106. Tanzawa, K., Shimada, Y., Kuroda, M., Tsujita, Y., Arai, M., Watanabe, M. *WHHL-rabbit: a low density lipoprotein receptor-deficient animal model for familial hypercholesterolemia*. In: FEBS Lett, 1980; 25118 (1): 81-84
 107. Watanabe, Y., Ito, T., Saeki, M., Kuroda, M., Tanzawa, K., Mochizuki, M., Tsujita, Y., Arai, M. *Hypolipidemic effects of CS-500 (ML-236B) in WHHL-rabbit, a heritable animal model for hypercholesterolemia*. In: Atherosclerosis, 1981; 38 (1-2): 27-31
 108. Zsigmond, E., Kobayashi, K., Tzung, K.-W., Li, L., Fuke, Y., Chan, L. *Adenovirus-Mediated Gene Transfer of Human Lipoprotein Lipase Ameliorates the Hyperlipidemias Associated with Apolipoprotein E and LDL Receptor Deficiencies in Mice*. In: Hum Gene Ther; 8: 1921-1933
 109. Van Dijk, K. W., Van Vlijmen, B. J. M., Van der Zee, A., Van't Hof, B., Van der Boom, H., Kobayashi, K., Chan, L., Havekes, L. M., Hofker, M. H. *Reversal of Hypercholesterolemia in Apolipoprotein E2 and Apolipoprotein E3-Leiden Transgenic Mice by Adenovirus-Mediated Gene Transfer of the VLDL Receptor*. In: Arterioscler Thromb Vasc Biol; 18(1): 7-12
 110. Chan, L., *Use of somatic gene transfer to study lipoprotein metabolism in experimental animals in vivo*. In: Curr Opin Lipidol, 1995; 6(5): 335-340
 111. Schneider, D. B., Fly, C. A., Dichek, D. A., Geary, R. L. *Adenoviral Gene Transfer in Arteries of Hypercholesterolemic Nonhuman Primates*. In: Human Gene Therapy, 1998; 9: 815-821
 112. Sullivan, D. E., Dash, S., Du, H., Hiramatsu, N., Aydin, F., Kolls, J., Blanchard, J., Baskin, G., Gerber, M. A. *Liver-Directed Gene Transfer in Non-Human Primates*. In: Hum Gene Ther, 1997; 8: 1195-1206
 113. Raper, S. E., Haskal, Z. J., Ye, X., Pugh, C., Furth, E. E., Gao, G.-P., Wilson, J. M. *Selective Gene Transfer into the Liver of Non-Human Primates with E1-Deleted, E2A-Defective, or E1-E4 Deleted Recombinant Adenoviruses*. In: Hum Gene Ther, 1998; 9: 671-679

114. Gunsalus, J. R., Brady, D. A., Coulter, S. M., Gray, B. M., Edge, S. B. *Reduction of serum cholesterol in Watanabe rabbits by xenogenic hepatocellular transplantation.* In: Nat Med, 1997; 3(1): 48-53
115. Schmidt, H.-J., Sturmann, M., Shamburek, R., Schewe, C., Ebhardt, M., La, Z., Büttner, C., Wendt, M., Beisiegel, U., Brewer H. et al. *Delayed catabolism despite a functional intact LDL-apolipoprotein B particle and LDL-receptor in a subject with clinical homozygous familial hypercholesterolemia.* In: J Clin Endocrinol Metab, 1998; 83: 2167-2174
116. Knoell, D. L., Yiu, I. M. *Human gene therapy for hereditary diseases: A review of trials.* In: Am J Health Syst Pharm, 1998; 55: 899-904
117. Raper, S. E., McClane, S. J. *Gene Transfer Strategies for Metabolic Diseases.* In: World J Surg, 2002; 26(7): 838-842
118. Wilson, J. M., Grossman, M. *Therapeutic strategies for familial hypercholesterolemia based on somatic gene transfer.* In: Am J Cardiol, 1993; 72: 59D-63D
119. Grasso, A. W., Wu, G. Y. *Therapeutic Implications of Delivery and Expression of Foreign Genes in Hepatocytes.* In: Adv Pharmacol, 1994; 28: 169-192
120. Kozarsky, K., Grossman, M., Wilson, J. M. *Adenovirus-Mediated Correction of the Genetic Defect in Hepatocytes from Patients with Familial Hypercholesterolemia.* In: Somat Cell Mol Genet, 1993; 19(5): 449-458
121. Gerard, R. D., Chan, L. *Adenovirus-mediated gene transfer: strategies and applications in lipoprotein research.* In: Curr Opin Lipidol, 1996; 7(105): 105-111
122. Ilan, Y., Prakash, R., Davidson, A., Jona, V., Droguett, G., Horwitz, M. S., Chowdhury, N. R., Chowdhury, J. R. *Oral tolerization to adenoviral antigens permits long-term gene expression using recombinant adenoviral vectors.* J Clin Invest, 1997; 99(5): 1098-1106
123. Morral, N., O'Neal, W., Zhou, H., Langston, C., Beaudet, A. *Immune responses to reporter proteins and high viral dose limit duration of expression with adenoviral vectors: comparison of E2a wild type and E2a deleted vectors.* In: Hum Gene Ther,

1997; 8: 1275-1286

124. Smith, T. A. G., White, B. D., Gardner, J. M., Kaleko, M., McClelland, A. *Transient immunosuppression permits successful repetitive intravenous administration of an adenovirus vector*. Gene Ther, 1996; 3: 496-502
125. Marshall, E. *Gene therapy death prompts review of adenovirus vector*. Science, 1999; 286(5448): 2244-2245
126. Hollon, T. *Researchers and regulators reflect on first gene therapy death*. Nat Med, 2000; 6(1): 6
127. Sibbald, B. *Death but one unintended consequence of gene-therapy trial*. CMAJ, 2001; 164(11): 1612

ERKLÄRUNG AN EIDES STATT

Ich erkläre, dass ich die am Universitätsklinikum Charité – Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin - zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Einfluß einer Virusdosisescalation beim adenoviralen LDL-Rezeptorgentransfer im Kaninchenmodell

im Insitut für Gastroenterologie und Hepatologie der Medizinischen Hochschule Hannover unter Betreuung von PD Dr. Hartmut Schmidt selbst und ohne die Hilfe Dritter verfasst habe, dass sie auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Dortmund, 02.05.2004

Nicole Grewe

DANKSAGUNG

Hiermit möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die das Entstehen dieser Dissertation möglich gemacht haben.

Zunächst möchte ich in diesem Zusammenhang Herrn Prof. Dr. M. P. Manns nennen, der mir die Möglichkeit gab, die Versuche für diese Dissertation in der Abteilung Gastroenterologie und Hepatologie der Medizinischen Hochschule Hannover durchzuführen.

Meine außerordentliche Wertschätzung und Dankbarkeit gilt meinem Doktorvater Herrn Privat-Dozent Dr. H. H.-J. Schmidt, dessen Kompetenz und Förderung von unschätzbarem Ausmaß für das Gelingen dieser Arbeit waren. Durch seine Unterstützung und Motivation hat er mich im wissenschaftlichen Arbeiten bestärkt und meinen akademischen Werdegang entscheidend geprägt.

Weiterhin bin ich Herrn Prof. Dr. M. Strauss sowie Herrn Dr. G. Cichon vom Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch zu großem Dank verpflichtet.

Darüber hinaus gebührt mein Dank den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung für Nuklearmedizin der Medizinischen Hochschule Hannover, insbesondere Herrn Prof. Dr. W. Burchert, Herrn Dr. P. Gielow, Herrn Dr. T. Petrich sowie Frau Krull und Frau Messerschmidt.

Ferner möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hedrich, Herrn Dr. Maess sowie Herrn Wallbrecht aus der Abteilung Zentrales Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover bedanken.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Frau Dr. J. Genschel und Herrn Dr. C. Büttner sowie den übrigen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern aus dem Labor für Klinische Diätetik der Abteilung Gastroenterologie und Hepatologie der Medizinischen Hochschule Hannover, die maßgeblich an der Entstehung dieser Dissertation beteiligt waren: Regina, Marcus, Monika, Peter, Sybilla, Kerstin, Susanne und Frau Ohlendorf.

Besonders wertvoll war für mich jedoch die Unterstützung durch meinen Lebensgefährten Herrn Dr. S. Jobst, der mich in den vergangenen Jahren fortwährend motiviert und unterstützt hat.